

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Anita Milošić

UTJECAJ ČESTICA NANOSREBRA NA RAST I POJAVU  
OKSIDACIJSKOG STRESA U KORJENČIĆIMA LUKA  
(*Allium cepa* L.)

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2014.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Anita Milošić

UTJECAJ ČESTICA NANOSREBRA NA RAST I POJAVU  
OKSIDACIJSKOG STRESA U KORJENČIĆIMA LUKA  
(*Allium cepa* L.)

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2014.

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Biljane Balen, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu zbog stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### UTJECAJ NANOČESTICA SREBRA NA RAST I POJAVU OKSIDACIJSKOG STRESA U KORJENČIĆIMA LUKA (*Allium cepa* L.)

Anita Milošić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

Nanočestice su trenutno vrlo živo područje istraživanja zahvaljujući svojim jedinstvenim električnim, kemijskim i fizičkim svojstvima, a zbog sve češće tržišne uporabe postavlja se pitanje koliko su štetne za žive organizme i okoliš. U ovom radu istražen je utjecaj nanočestica srebra (AgNP) na rast i pojavu oksidacijskog stresa u korjenčićima luka. Uspoređena je toksičnost primijenjenih koncentracija (25, 50, 75, 100 i 500  $\mu$ M) AgNP s učinkom ionskog srebra ( $\text{AgNO}_3$ ) istih koncentracija. Također je uspoređen učinak nanosrebra stabiliziranog s tri različita organska omotača (AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNP-CTAB). Rezultati su pokazali da je ionsko srebro pri svim ispitanim koncentracijama jače inhibiralo rast korjenčića luka od nanosrebra. Sadržaj malondialdehida (MDA), kao pokazatelja oksidacijskog stresa, bio je povećan nakon tretmana ionskim srebrom i nanosrebrom AgNP-CTAB, a smanjen nakon tretmana nanosrebrom AgNP-citrat i AgNP-PVP. Sadržaj proteinskih karbonila bio je smanjen nakon tretmana ionskim srebrom, dok je samo nanosrebro AgNP-citrat pokazalo smanjenje sadržaja karbonila kako su rasle ispitane koncentracije. Tretmani nanosrebrom AgNP-PVP i AgNP-CTAB nisu doveli do promjene u sadržaju karbonila u odnosu na kontrolu. Sva tri ispitana antioksidacijska enzima (katalaza, pirogalol peroksidaza i askorbat peroksidaza) pokazala su promjene u aktivnosti, koje su posljedica izlaganja korjenčića ionskom srebrom i nanosrebrom.

(43 stranice, 12 slika, 4 tablice, 53 literaturna navoda, hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Allium cepa*, antioksidacijski enzimi, lipidna peroksidacija, nanočestice srebra, oksidacijski stres, proteinski karbonili

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Biljana Balen

Ocjenitelji: izv. prof. dr. sc. Biljana Balen, izv. prof. dr. sc. Mirta Tkalec, doc. dr.sc. Martina Šeruga Musić

Rad prihvaćen: 10.7.2014.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

### INFLUENCE OF SILVER NANOPARTICLES ON GROWTH AND APPEARANCE OF OXIDATIVE STRESS IN *Allium cepa* ROOTS

Anita Milošić

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb

Nanoparticles became the subject of interest in science thanks to their unique electric, chemical and physical properties. Since they are commonly used in consumer products, there is a need to investigate their possible negative effect on living organisms and environment. The present study investigated the effect of silver nanoparticles (AgNP) on growth and appearance of oxidative stress in *A. cepa* roots. The toxicity of AgNPs and AgNO<sub>3</sub> applied at the same concentrations (25, 50, 75, 100 and 500 µM) was also compared. The effect of three different organic coatings, AgNP-citrate, AgNP-PVP and AgNP-CTAB, was additionally analysed. The results showed that ionic silver inhibited root growth more strongly than AgNP. Malondialdehyde (MDA) content, as a parameter of oxidative stress, was increased after treatment with ionic silver and nanosilver AgNP-CTAB and decreased after treatment with nanosilver AgNP-citrate and AgNP-PVP. Protein carbonyl content was also decreased after treatment with ionic silver and AgNP-citrate, and no changes were observed after AgNP-PVP and AgNP-CTAB treatment. All of three investigated antioxidant enzymes (CAT, PPX, APX) showed changes in activity that could be a consequence of root exposure to ionic and nanosilver.

(43 pages, 12 figures, 4 tables, 53 references, original in: croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: *Allium cepa*, antioxidative enzymes, lipid peroxidation, oxidative stress, protein carbonyls, silver nanoparticles

Supervisor: dr. sc. Biljana Balen, Assoc. Prof.

Reviewers: dr. sc. Biljana Balen, Assoc. Prof., dr. sc. Mirta Tkalec, Assoc. Prof., doc. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Thesis accepted: 10.7. 2014.

## **POPIS KRATICA I SIMBOLA**

AA - akrilamid

AgNP - nanočestice srebra

APS - amonijev peroksodisulfat

Bis - bisakrilamid

BSA - serumski goveđi albumin

CBB - Comassie Brilliant Blue

CTAB - cetiltrimetilamonijev bromid

DNPH - 2,4-dinitrofenilhidrazin

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina

HCl - klorovodična kiselina

MDA - malondialdehid

NBT - nitroblue tetrazolium

PAGE - poliakrilamid gel elektroforeza

PVP - polivinilpirolidon

ROS - reaktivni oblici kisika

TBA - tiobarbiturna kiselina

TCA - trikloroctena kiselina

TEMED - tetrametiletetilendiamin

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Nanočestice srebra (AgNP).....	1
1.2. Vrsta <i>Allium cepa</i> kao modelni organizam.....	2
1.3. Oksidacijski stres.....	3
1.3.1. Lipidna peroksidacija membrana i oksidacija proteina.....	4
1.3.2. Antioksidacijski enzimi.....	5
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>8</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>9</b>
3.1. Materijal.....	9
3.1.1. Nanočestice srebra (AgNP).....	9
3.1.2. Biljni materijal.....	10
3.2. Metode.....	10
3.2.1. Morfometrija.....	10
3.2.2. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina.....	11
3.2.3. Određivanje koncentracije proteina.....	11
3.2.4. Ekstrakcija lipida.....	12
3.2.5. Određivanje sadržaja malondialdehida (MDA).....	12
3.2.6. Određivanje sadržaja proteinskih karbonila.....	13
3.2.7. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima.....	14
3.2.7.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze (CAT).....	14
3.2.7.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze (PPX).....	14
3.2.7.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze (APX).....	15
3.2.8. Razdvajanje proteina nativnom poliakrilamid gel elektroforezom (PAGE).....	16

3.2.9. Određivanje aktivnosti i broja izoformi antioksidacijskih enzima u gelu.....	17
3.2.9.1. Određivanje aktivnosti i broja izoformi katalaze u gelu.....	17
3.2.9.2. Određivanje aktivnosti i broja izoformi pirogalol peroksidaze u gelu.....	17
3.2.9.3. Određivanje aktivnosti i broja izoformi askorbat peroksidaze u gelu.....	17
3.3. Statistička obrada podataka.....	17
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>18</b>
4.1. Morfometrija.....	18
4.2. Koncentracija proteina.....	20
4.3. Sadržaj MDA.....	21
4.4. Sadržaj proteinskih karbonila.....	22
4.5. Aktivnost antioksidacijskih enzima.....	23
4.5.1. Aktivnost katalaze (CAT).....	23
4.5.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze (PPX).....	24
4.5.3. Aktivnost askorbat peroksidaze (APX).....	25
4.6. Aktivnost antioksidacijskih enzima u gelu.....	26
4.6.1. Aktivnost katalaze (CAT) u gelu.....	26
4.6.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze (PPX)u gelu.....	28
4.6.3. Aktivnost askorbat peroksidaze (APX) u gelu.....	30
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>32</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>38</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>39</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>43</b>



*Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Biljani Balen na razumijevanju, stručnoj pomoći, ukazanom povjerenju te korisnim savjetima tijekom izrade eksperimentalnog i pisanog dijela rada.*

*Zahvaljujem dr. sc. Petri Cvjetko na iznimno ugodnoj zajedničkoj suradnji u laboratoriju tijekom eksperimenata, na svim savjetima, pomoći i strpljenju kojeg je pokazivala.*

*Zahvaljujem svojoj predivnoj kolegici Suyeon Sue Yu na nezaboravnim zajedničkim trenucima u laboratoriju i druženju izvan njega.*

*Zahvaljujem i ostalim suradnicima na ovom diplomskom radu, Ana-Mariji Domijan i Ivani Vinković-Vrčec.*

*Zahvaljujem i svim zaposlenicima i kolegama Zavoda za molekularnu biologiju na ugodnoj atmosferi tijekom rada u laboratoriju.*

*Zahvaljujem svojim roditeljima i bratu na podršci tijekom cijelog studija.*

*Anita Milošić*

UVOD

## 1. UVOD

### 1.1. Nanočestice srebra (AgNP)

Nanomaterijali su čestice nanovelikine ( $10^{-9}$  nm), a prefiks *nano* može se odnositi i na vrijeme (nanosekunda), volumen (nanolitar) i masu (nanogram). Nanomaterijale možemo podijeliti u tri podskupine: nanofilmovi (imaju jednu dimenziju između 1 nm i 100 nm), nanocjevčice (imaju dvije dimenzije između 1 nm i 100 nm) i nanočestice (imaju sve tri dimenzije između 1 nm i 100 nm) (Sekhon, 2014). Nanostrukturirani materijali vrlo su živo područje istraživanja u svijetu zahvaljujući svojim jedinstvenim električnim, kemijskim i fizičkim svojstvima te se stoga sve više rabe u elektroničkoj industriji, medicini, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, proizvodnji energije i remedijaciji okoliša (Ivanković, 2011, Vannini i sur., 2013). No, uz golem tržišni potencijal oni donose i nove rizike. Naime, nanočestice su, zbog velike površine, vrlo reaktivne te posljednjih godina raste broj istraživanja vezanih za štetne učinke nanomaterijala na žive organizme.

Nanosrebro je najistraženiji i najkorišteniji oblik nanočestica u biološkim sustavima. Nanosrebro samo po sebi nije ništa novo niti revolucionarno; još od prošlog stoljeća koristi se u medicini, kao i pri razvijanju fotografija te filtriranju vode za piće. Nedavni napredak u sintetiziranju nanosrebra doveo je do toga da se nanočestice srebra mogu dopremiti na mjesta gdje nikada prije to nije bilo moguće (prolazak unutar stanice ili kroz krvno-moždanu barijeru) i zahvaljujući tome, nanosrebro danas možemo naći u atletskoj odjeći, kozmetici, dječjim bočicama pa sve do bolničke opreme i proizvodnje kreveta i kupaona (Seltenrich, 2013). Srebro je odavno poznato po svojim iznimnim antibakterijskim svojstvima, no transformacijom u ovako male čestice njegova djelotvornost povećana je tisuće puta pa su antimikrobna i antiseptička svojstva srebra postala još učinkovitija. Godine 2012. laboratorijski je dokazan učinak gela na bazi nanosrebra koji ubija neke sojeve *Staphylococcus aureus* (MRSA) otporne na meticilin te enterokoke otporne na vankomicin (VRE) (Seltenrich, 2013). Unatoč širokoj upotrebi, nanosrebro je ipak slabo istražen materijal.

Omjer veličine čestica i volumena u nanostrukturama je važan jer, što je čestica manja, to je omjer veći, a time se povećava i reaktivnost nanočestica, odnosno potencijal da atomi srebra budu otpušteni. Posljednjih godina raste broj istraživanja vezanih za štetne učinke nanosrebra na žive organizme, a od posebnog je interesa utjecaj na biljke. Zašto? Upravo zato jer su biljke neizostavna i esencijalna komponenta svakog ekosustava i igraju ključnu ulogu u transportu projektiranih nanočestica (*engineered nanoparticles*, ENPs) u okoliš, putem unosa i bioakumulacije nanočestica u biljci (Monica i Cremonini, 2009). Naglasak je na istraživanju genotoksičnih i citotoksičnih učinaka nanosrebra na biljku,

odnosno biljne stanice. Nekoliko dosadašnjih istraživanja pokazalo je pozitivne i negativne učinke nanomaterijala na više biljke. Nanočestice SiO<sub>2</sub> i TiO<sub>2</sub> poboljšale su aktivnost enzima nitrat reduktaze u soji i tako ubrzali klijanje i rast (Lu i sur., 2002). Također je dokazano da nano-TiO<sub>2</sub> unaprjeđuje fotosintezu i metabolizam dušika te tako poboljšava rast špinata (Zheng i sur., 2005). Na luku (*Allium cepa*) je provedeno istraživanje koje je pokazalo da nanočestice srebra (AgNP) izazivaju citotoksičnost, kao i neke kromosomske aberacije u stanicama korjenčića (Kumari i sur., 2009), a u biljnoj vrsti *Ricinus communis* nanočestice srebra, kao i ionsko srebro, izazivaju povećanu aktivnost antioksidacijskih enzima (katalaze, peroksidaze i superoksid dismutaze) (Yasur i Rani, 2013). Songa i sur. (2013) pokazali su inhibiciju rasta korijena uzrokovanu tretmanom nanočesticama srebra u rajčici, *Lycopersicum esculentum*.

Organski omotači koji stabiliziraju nanočestice srebra, a koje sam koristila u istraživanju su citrat, polivinilpirolidon (PVP) i cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB). Citrat i PVP najčešće su korišteni organski omotači za nanočestice srebra jer oni omogućavaju učinkovito raspršenje nanočestica. Osim toga, oni daju stabilnost i određeni naboj nanočestici srebra (Silva i sur., 2014). Prema navodima iz literature, CTAB omotač često se koristi kao omotač i za neke druge nanočestice (zlatu-Au, magnetit Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) (Faraji i sur., 2010, Cheung i sur., 2012). Citrat daje negativni, a CTAB pozitivni naboj, dok PVP omotač ne daje nikakav naboj nanočestici, već čestica ostaje neutralna.

U svom diplomskom radu htjela sam ispitati utječu li nanočestice srebra (AgNP), stabilizirane trima različitim omotačima, na pojavu oksidacijskog stresa u modelnoj biljci luku.

## **1.2. Vrsta *Allium cepa* kao modelni organizam**

U istraživanjima se često koriste više biljke kao učinkovito i osjetljivo biološko “oruđe” za ispitivanje razine kontaminacije tla, atmosfere, površinskih i podzemnih voda i dr. Luk (*Allium cepa*) rasprostranjen je širom Europe, Azije, Afrike i Amerike, a njegova godišnja proizvodnja premašuje nekoliko milijuna tona. Godine 1938. *A. cepa* je prvi puta korišten kao modelni organizam u citogenetičkim testovima ispitivanja učinka kolhicina. Ova se biljna vrsta od tada koristi kao bioindikator različitih vrsta onečišćenja i kontaminacija te kao modelni organizam za istraživanja *in vivo* u molekularnoj i staničnoj biologiji zbog brojnih prednosti kao što su - lak uzgoj i održavanje, visoka osjetljivost na promijenjene uvjete, kratko vrijeme klijanja, stalne mitotske diobe, jednostavnost manipulacije, mali volumen uzorka potreban za eksperiment, niska cijena i dr. Toksikološka ispitivanja na *A. cepa* vrlo su dobri pokazatelji bioakumulacije kemijskih supstanci u određenim tkivima, inhibicije rasta

korijena i listova, citogenetičkih ili mutagenih učinaka te odgovora na oksidacijski stres (Geremias i sur., 2009). Bioakumulacija u određenim tkivima, kao i inhibicija rasta korijena i listova mogu se vrlo lako izmjeriti i vrednovati. U dosadašnjim istraživanjima naglašena je upravo praktična upotreba *A. cepa* u takvim biotestovima (Geremias i sur., 2011).

Razlog zašto sam upravo ovu biljnu vrstu izabrala kao modelni organizam u svome diplomskom radu bila je mogućnost postavljanja eksperimenta na način da korijenje luka raste u neposrednom kontaktu sa supstancom koju istražujem, tj. uronjeno u otopinu nanočestica srebra, kako bih utvrdila je li nanosrebro uzrokuje pojavu oksidacijskog stresa u biljnim stanicama. Dobivene rezultate moguće je ekstrapolirati i na neke druge biljne vrste.

### 1.3. Oksidacijski stres

Prije 2.7 milijuna godina fotosintetski organizmi uveli su molekularni kisik u naš okoliš, a s njime i nepozvane pratitelje aerobnog života, reaktivne oblike kisika (ROS). Najveći proizvođači ROS u biljnoj stanici su kloroplasti, mitohondriji i peroksisomi. Reaktivni oblici kisika nastaju u određenoj količini tijekom normalne aerobne metaboličke aktivnosti u stanici, npr. u dišnom lancu u mitohondrijima, lancu prijenosa elektrona u kloroplastima i fotorespiraciji u peroksisomima. U ROS ubrajamo superoksidni radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), singletni kisik ( $^1O_2$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i hidroksilni radikal ( $OH^{\cdot}$ ). To su djelomično reducirani oblici atmosferskog kisika ( $O_2$ ). Kada koncentracija ROS nadmaši obrambeni antioksidacijski kapacitet stanice, javlja se oksidacijski stres. Oksidacijski stres u biljci nastaje kao posljedica izlaganja biljke stresnim uvjetima kao što su povišeni salinitet, temperaturni ekstremi, suša, teški metali i dr. Različite vrste abiotičkog stresa dovode do prekomjerne proizvodnje ROS, koji su vrlo reaktivni i toksični te uzrokuju oštećenja proteina, lipida, ugljikohidrata i DNA u biljnim stanicama. Upravo su procesi fotorespiracije u peroksisomima, staničnog disanja u mitohondrijima i procesa na fotosintetskim membranama u kloroplastima izvori povišene koncentracije ROS u stanici tijekom izlaganja stresu. U stresnim uvjetima ROS mogu imati ulogu signalnih molekula te tako dovesti do ekspresije gena važnih za biosintezu antioksidacijskih enzima i drugih molekula važnih za obranu biljke. ROS se smatraju staničnim indikatorima stresa i sekundarnim glasnicima uključenim u signalni put odgovora na stres (Mittler, 2012). Umjereni oksidacijski stres aktivira antioksidacijski odgovor i dovodi do prilagodbe biljke, ali ukoliko je oksidacijski stres snažan i dugotrajan te ako zakaže biljni obrambeni mehanizam, stresni čimbenici nastavljaju djelovati, a daljnja proizvodnja štetnih ROS uzrokovat će oštećenja proteina, membranskih lipida i nukleinskih kiselina, što konačno može dovesti i do smrti stanice.

Kako bi se obranile od stresa i štetnih učinaka toksičnih reaktivnih oblika kisika, biljke su razvile antioksidacijski obrambeni sustav u svojim stanicama i organelima (kloroplastima, mitohondrijima, peroksisomima). Komponentama obrambenog mehanizma biljke pripadaju enzimatski i ne-enzimatski antioksidansi. Enzimatski antioksidansi uključuju: superoksid dismutazu (SOD), katalazu (CAT), askorbat peroksidazu (APX), pirogalol peroksidazu (PPX), glutathion reduktazu (GR), monodehidroaskorbat reduktazu (MDHAR), dehidroaskorbat reduktazu (DHAR), glutathion S-transferazu (GST) i glutathion peroksidazu (GPX). Ne-enzimatski antioksidansi uključuju: askorbinsku kiselinu, glutathione, prolin, tokoferole, karotenoide i flavonoide. ROS se teško mjere direktno jer imaju kratko vrijeme poluživota. Prisutnost ROS kao pokazatelja oksidacijskog stresa može se detektirati mjerenjem krajnjih produkata lančane reakcije koji imaju znatno duže vrijeme poluživota, kao što su lipidni peroksidi. Nadalje, kao mjerljive parametre oksidacijskog stresa koriste se promjene u aktivnosti enzima antioksidacijskog sustava. Za rano otkrivanje oksidacijskog stresa koriste se biokemijski pokazatelji koji se spektrofotometrijski određuju iz ekstrakata biljnog tkiva. Određivanje biokemijskih pokazatelja vrlo je važno u procjeni štetnosti okolišnih čimbenika zato što se metaboličke promjene uvijek javljaju i prije pojave vidljivih simptoma. Isto tako, u svrhu procjene djelovanja stresnih čimbenika koristi se i istraživanje izoformi antioksidacijskih enzima jer uslijed stresnih čimbenika dolazi do različite zastupljenosti pojedinih izoenzima. U svome radu analizirala sam razinu lipidne peroksidacije i sadržaj proteinskih karbonila kao pokazatelje oksidacijskog stresa. Mjerila sam i aktivnost antioksidacijskih enzima katalaze, pirogalol peroksidaze i askorbat peroksidaze kako bih utvrdila je li došlo do aktivacije antioksidacijskog sustava biljke.

### **1.3.1. Lipidna peroksidacija membrana i oksidacija proteina**

Lipidna peroksidacija smatra se procesom koji dovodi do najvećeg oštećenja u svakom živom organizmu. Naime, kada se razina ROS u stanici poveća toliko da ih više obrambeni sustav u biljci ne može uklanjati, tada raste razina lipidne peroksidacije u biljnim membranama, što za posljedicu ima promjene na cjelokupno fiziološko funkcioniranje stanice (Labudda, 2013). Prilikom peroksidacije lipida u membrani iz polinezasićenih masnih kiselina stvaraju se produkti kao što su ketoni i malondialdehid (MDA) te oni reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (TBA) i formiraju obojene produkte nazvane tiobarbiturne reaktivne supstance (TBARS). MDA je jedan od konačnih produkata modifikacije lipida. Sadržaj MDA je mjerljivi parametar koji se određuje spektrofotometrijski na valnoj duljini od 532 nm. Peroksidacija lipida indikator je oksidacijskog stresa u biljnim membranama i najočitiji je simptom oksidacijskog stresa u biljci. Lipidna peroksidacija i nastanak MDA utječu na neka

svojstva membrana kao što su transport iona, smanjenje fluidnosti membrana; fosfolipidi se lakše izmjenjuju između dvosloja lipida, povećava se propusnost membrana pa neke supstance prolaze kroz membranu, što u normalnim uvjetima ne bi mogle (Gill i Tuteja, 2010). Polinezasićene masne kiseline, komponente membranskih lipida, vrlo su osjetljive na aktivnost ROS. Proces lipidne peroksidacije sastoji se od tri dijela: inicijacije, propagacije i terminacije. U procesu inicijacije nastaju radikali masnih kiselina. Hidroksilni ili superoksidni radikali mogu reagirati sa metilenskim grupama na polinezasićenim masnim kiselinama pri čemu nastaju hidroperoksidi i lipidni peroksi-radikali, koji mogu dalje ići u fazu propagacije. Razgradnjom lipidnih hidroperoksida nastaju različiti aldehidi (malondialdehid, krotonaldehid i akrolein), lipidni epoksidi i alkoholi (Labudda, 2013).

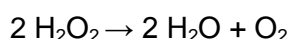
Karbonilacija proteina koristi se kao pokazatelj oksidacije proteina, odnosno kao pokazatelj oksidacijskog stresa u biljkama. Oksidacija proteina je kovalentna modifikacija proteina, odnosno amino kiselina, potaknuta reaktivnim oblicima kisika ili oksidacijskim stresom, koja daje slobodnu karbonilnu skupinu, time inhibirajući ili alternirajući aktivnost proteina (Gill i Tuteja, 2010). Kada se aminokiselinski lanci proteina oksidiraju (posebno Pro, Lys, Thr, Arg), stvaraju se karbonilne (C=O) skupine (aldehidi i ketoni). Takvi novonastali oblici su stabilni, što je dobro za detekciju i skladištenje. Oni reagiraju s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) pri čemu nastaje stabilni dinitrofenil hidrazon, koji može biti detektiran različitim metodama, od kojih je jedna i spektrofotometrijski (Dalle-Donne i sur., 2003). Izlaganje proteina reaktivnim oblicima kisika na staničnoj razini izaziva specifične modifikacije aminokiselinskih lanaca, fragmentacije peptidnih lanaca, agregacije unakrsno vezanih produkata reakcije, promjene električnog naboja i povećanu osjetljivost na proteolizu. Karbonili se koriste kao biljezi procjene oksidacijskog oštećenja proteina jer je formiranje karbonila u većoj mjeri učestalije od ostalih oksidacijskih oštećenja proteina.

### **1.3.2. Antioksidacijski enzimi**

Katalaze (EC 1.11.1.6.) su tetramerni enzimi koji sadrže molekule hema, a imaju sposobnost dismutirati  $\text{H}_2\text{O}_2$  u  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{O}_2$ . Nalazimo ih u svim aerobnim organizmima koji su izloženi kisiku, a važne su zbog uklanjanja vodikovog peroksida u peroksisomima, koji nastaje uslijed oksidacije masnih kiselina i fotorespiracije. Katalaza može ukloniti vodikov peroksid na dva načina: direktnom dismutacijom ili oksidacijom alkohola, formaldehida ili nitrita vodikovim peroksidom. Katalaza ima visoku katalitičku aktivnost, ali slabu supstratnu specifičnost jer je potrebno istovremeno vezanje dviju molekula vodikovog peroksida u aktivnom mjestu. Katalaza ima tri izoenzima. Prve dvije izoforme (CAT1 i CAT2) nalaze se u peroksisomima i citosolu, a treća (CAT3) se nalazi u mitohondrijima. Aktivnost gena koji

kodiraju enzim katalazu u stanici je stalna, a razina aktivnosti može se naglo promijeniti pod stresnim uvjetima koji često djeluju na razini translacije. Zapažena je različita aktivnost katalaze prilikom izlaganja biljaka teškim metalima. Nakon tretmana kadmijem (Cd) pad aktivnosti katalaze zabilježen je u vrstama *Glycine max*, *Phragmites australis*, *Capsicum annum* i *Arabidopsis thaliana*, dok je porast izmjeren u vrstama *Oryza sativa*, *Brassica juncea* i *Triticum aestivum* (Gill i Tuteja, 2010). Nakon tretmana bakrom (Cu) aktivnost katalaze se smanjila u vrstama *Brassica oleracea* i *Brassica juncea* (Posmyk i sur., 2009).

U peroksisomima katalaza katalizira sljedeću reakciju:

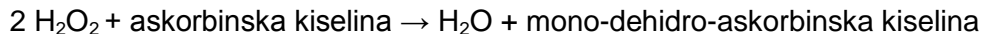


Peroksidaze su enzimi široko rasprostranjeni u biljnome i životinjskome svijetu. Sve biljne peroksidaze su monomerni glikoproteini molekulskih masa od 32 do 45 kDa i pripadaju velikoj porodici enzima oksidoreduktaza koje općenito kataliziraju razgradnju  $\text{H}_2\text{O}_2$  uz nastanak  $\text{H}_2\text{O}$ , koristeći vodikov peroksid kao supstrat, tj. primatelj elektrona. Kao prostetičku skupinu imaju hem ( $\text{Fe}^{3+}$  - protoporfirin IX) koji se preko dva histidina veže s glikoproteinskim dijelom enzima. Ugljikohidratni dio glikoproteina sastoji se od glukoze, manoze, arabinoze, ksiloze, fukoze i heksozamina. Analiza aminokiselinskog sastava peroksidaza različitog porijekla pokazuje visoku konzerviranost segmenata polipeptida koji čine aktivno mjesto enzima, dok se sastav aminokiselina na površini molekule razlikuje. Istraživanja su potvrdila ulogu peroksidaza u biosintezi lignina, izgradnji komponenti stanične stijenke, katabolizmu auksina, borbi protiv patogena i starenju (Hiraga i sur., 2001). Peroksidaze se nalaze u različitim staničnim odjeljcima: vakuoli, Golgijevom tijelu, endoplazmatskom retikulumu i mitohondrijima te u staničnoj stijenci i izvanstaničnom prostoru.

Pirogalol peroksidaza (PPX, EC 1.11.1.7) tek je jedna od mnogih peroksidaza koje se razlikuju prema supstratu koji koriste za razgradnju  $\text{H}_2\text{O}_2$ . PPX ima više supstrata, među kojima je i pirogalol, koji služi kao donor elektrona. Pirogalol peroksidazu ubrajamo u nespecifične peroksidaze koje koriste vodikov peroksid za različite oksidacijske reakcije čija je karakteristika slaba specifičnost. Nalazimo ih u mnogim staničnim odjeljcima (vakuola, Golgijevo tijelo, mitohondriji i dr.), stoga postoje i mnoge izoforme. Izoforme imaju različiti neto naboj i masu pa se mogu razdvojiti elektroforezom u nativnim uvjetima. Elektroforetska pokretljivost izoenzima ovisi o gustoći naboja molekule, molekularnoj masi i izoelektričnoj točki. Molekularna masa kreće im se u rasponu od 30 do 50 kDa (Hiraga i sur., 2001). Na osnovu smjera kretanja u električnom polju dijele se na anionske (kisele) i kationske (bazične).



Askorbat peroksidazu (APX, EC 1.11.1.11) ubrajamo u skupinu peroksidaza čija je glavna uloga uklanjanje vodikovog peroksida i organskih hidroperoksida te lipidnih peroksida kako ne bi došlo do nastajanja jako reaktivnih radikala koji oksidiraju stanične komponente i uzrokuju stanična oštećenja. Askorbat peroksidaza uključena je u prevođenje  $H_2O_2$  u dvije molekule vode pomoću askorbata i smatra se da taj enzim ima glavnu ulogu u pretvaranju ROS u manje reaktivne oblike te ima visoki afinitet za vodikov peroksid. Nalazimo ju u kloroplastima i citosolu. Dosadašnja istraživanja o ovom enzimu odnosi se uglavnom na askorbat peroksidaze iz kloroplasta i citosola (Arora i sur., 2002). APX obitelj sastoji se od najmanje pet izoformi koje imaju visoku specifičnost za askorbat kao donora elektrona. Jedna od karakteristika ovog enzima je nestabilnost u odsutnosti askorbata. Aktivnost APX gubi se kada koncentracija askorbata padne ispod  $20\ \mu M$  (Shigeoka i sur., 2002). Askorbat peroksidaza dio je glutation - askorbatnog ciklusa koji djeluje u citosolu i kloroplastima. Glutacion - askorbatni ciklus prvi se suprotstavlja vodikovom peroksidu, ukoliko zakaže njegovo uklanjanje u peroksisomima (Willekens i sur., 1997). Povišena aktivnost askorbat peroksidaze zapažena je u biljnim vrstama *Triticum aestivum*, *Brassica juncea* i *Vigna mungo* koje su bile podvrgnute tretmanu Cd (Gill i Tuteja, 2010). Dokazana je i povećana aktivnost askorbat peroksidaze u transgeničnoj vrsti *Nicotiana plumbaginifolia* kojoj je mutiran gen za katalazu. Reakcija koju katalizira askorbat peroksidaza:



CILJ ISTRAŽIVANJA

## 2. Cilj istraživanja

Znajući koliko su u današnje vrijeme nanočestice različitih metala, ne samo srebra, korištene u mnogim područjima ljudske djelatnosti, logično je da se nameće pitanje utječu li nanočestice negativno na okoliš i žive organizme. Stoga je cilj ovog istraživanja:

1. Utvrditi utječu li ispitivane koncentracije nanočestica srebra (AgNP) s različitim omotačima (AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNP-CTAB) na rast korjenčića luka.
2. Utvrditi izazivaju li ispitivane koncentracije nanočestica srebra s različitim omotačima (AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNP-CTAB) pojavu oksidacijskog stresa u korjenčićima luka analizom parametara oksidacijskog stresa (oštećenje membranskih lipida i oksidacija proteina) i aktivnosti antioksidacijskih enzima katalaze, pirogallol peroksidaze i askorbat peroksidaze.
3. Usporediti utjecaj ispitanih koncentracija nanočestica srebra (AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNP-CTAB) na navedene parametre s utjecajem ionskog srebra ( $\text{AgNO}_3$ ) primijenjenog u istim koncentracijama.

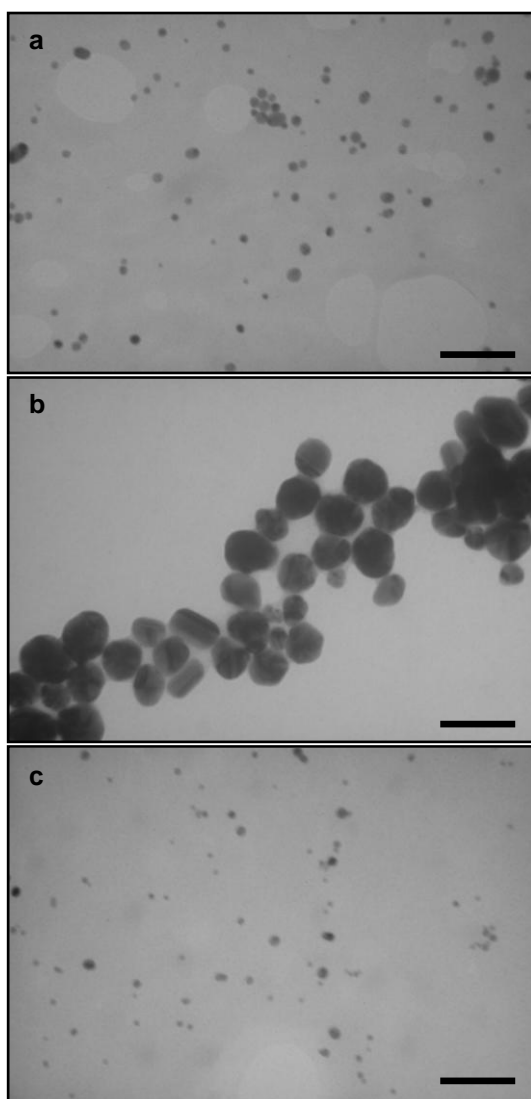
## MATERIJALI I METODE

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijal

##### 3.1.1 Nanočestice srebra (AgNP)

Redukcijskim postupkom pripravljene su AgNP iz  $\text{AgNO}_3$ , koje su zatim stabilizirane pomoću 3 vrste omotača: neutralnog polivinilpirolidona (PVP), negativno nabijenog citratnog aniona i pozitivno nabijenog cetiltrimetilamonijevog kationa (CTAB). Na taj su način dobivene 3 vrste nanočestica: neutralne (AgNP-PVP, Slika 1a), negativno nabijene (AgNP-izocitrat, Slika 1b) te pozitivno nabijene (AgNP-CTAB, Slika 1c).



**Slika 1.** Čestice nanosrebra (AgNP) pripravljene iz  $\text{AgNO}_3$  i stabilizirane pomoću 3 vrste omotača: a) neutralnog polivinilpirolidona (PVP; AgNP-PVP), b) negativno nabijenog citratnog aniona (AgNP-izocitrat) i c) pozitivno nabijenog cetiltrimetilamonijevog kationa (CTAB; AgNP-CTAB). Fotografije su snimljene pri povećanju od 85000 x. Bar = 100 nm. (AgNP pripremila i snimila I. Vinković-Vrček)

### 3.1.2. Biljni materijal

Istraživanje za svoj diplomski rad provodila sam na luku (*Allium cepa*). Luk je biljka iz porodice *Alliaceae* i jedan je od modelnih organizama koji se koriste u eksperimentalne svrhe. Glavice luka ostavila sam u vodi dva dana kako bi izrasli korjenčići, pazeći pri tome da ne ostanu na suhome. Glavice luka s korjenčićima uronila sam u otopine različitih koncentracija (25, 50, 75, 100, 500  $\mu\text{M}$ ) sintetiziranog nanosrebra (AgNP), stabiliziranog trima različitim omotačima (citrat, PVP, CTAB) te u otopine ionskog srebra ( $\text{AgNO}_3$ ) istih koncentracija (Tablica 1). Kao kontrole koristila sam korjenčiće lukovica uronjenih u vodu. Tretman izlaganja korjenčića navedenim otopinama trajao je 72 h.

**Tablica 1.** Primijenjeni tretmani ionskim srebrom ( $\text{AgNO}_3$ ) i nanočesticama srebra (AgNP)

Tretman	Koncentracija ( $\mu\text{M}$ )	Tretman	Koncentracija ( $\mu\text{M}$ )
$\text{AgNO}_3$	0	AgNP-PVP	0
$\text{AgNO}_3$	25	AgNP-PVP	25
$\text{AgNO}_3$	50	AgNP-PVP	50
$\text{AgNO}_3$	75	AgNP-PVP	75
$\text{AgNO}_3$	100	AgNP-PVP	100
$\text{AgNO}_3$	500	AgNP-PVP	500
AgNP-citrat	0	AgNP-CTAB	0
AgNP-citrat	25	AgNP-CTAB	25
AgNP-citrat	50	AgNP-CTAB	50
AgNP-citrat	75	AgNP-CTAB	75
AgNP-citrat	100	AgNP-CTAB	100
AgNP-citrat	500	AgNP-CTAB	500

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Morfometrija

Svakoj kontrolnoj i tretiranoj lukovici izmjerila sam duljinu dva najdulja korjenčića. Nakon što sam izračunala prosječnu duljinu korjenčića, uzela sam najreprezentativnije replike od svake koncentracije i fotografirala ih. To sam učinila za sve tretmane:  $\text{AgNO}_3$ , AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNP-CTAB.

### 3.2.2. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina

Korjenčiće luka isprala sam pod vodom i osušila te od svake replike izvagala 0.2 g tkiva. U ohlađeni tarionik stavila sam izvagano tkivo, malo PVP-a na vrhu spatule te dodala 1 mL (2 x 500 µL) hladnog 0.1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7.0 (Tablica 2.) i homogenirala tkivo. Homogenat je centrifugiran 15 min na 14000 rpm pri 4°C. Supernatante sam prebacila u čiste tubice te ponovno centrifugirala 60 min na 14000 rpm pri 4°C. Supernatante sam ponovo prebacila u čiste tubice te ih koristila za spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti antioksidacijskih enzima, određivanje izoformi antioksidacijskih enzima u gelu i za određivanje sadržaja proteinskih karbonila.

**Tablica 2.** Sastav pufera za ekstrakciju ukupnih topivih proteina

<b>0.1 M kalij-fosfatni pufer pH 7.0</b>	
<b>1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1.925 mL
<b>1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	3.075 mL
<b>reH<sub>2</sub>O</b>	do 50 mL

### 3.2.3. Određivanje koncentracije proteina

Koncentraciju proteina u proteinskim ekstraktima izmjerila sam metodom po Bradfordu (1976). Ova metoda temelji se na spektrofotometrijskom mjerenju apsorbancije produkta koji nastaje reakcijom proteina i reagensa (radna otopina Bradford, Tablica 3.), čiji je osnovni sastojak boja Comassie Brilliant Blue (CBB) G-250, na valnoj duljini od 595 nm. U 980 µL radne otopine Bradford dodala sam 20 µL uzorka proteina, promiješala na vortex-u i ostavila stajati 10 min. Koncentraciju proteina u svakom uzorku, izraženu u mg mL<sup>-1</sup> otopine, odredila sam očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina serumskog goveđeg albumina (BSA) poznatih koncentracija (0.2–2.0 mg mL<sup>-1</sup>) spektrofotometrom ATI/Unicam (model UV/VIS, Unicam, Engleska).

**Tablica 3.** Sastav otopina za mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

<b><u>radna otopina Bradford, 500 mL</u></b>	
<b>96% etanol</b>	15 mL
<b>88% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	30 mL
<b>matična otopina Bradford</b>	30 mL
<b>Re H<sub>2</sub>O</b>	425 mL
<b><u>matična otopina Bradford, 650 mL</u></b>	
<b>96% etanol</b>	100 mL
<b>88% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	200 mL
<b>boja Comassie Brilliant Blue G-250</b>	350 mL

### **3.2.4. Ekstrakcija lipida**

U ohlađenom tarioniku homogenirala sam 0.2 g tkiva korjenčića u 1300 µL (2 x 650 µL) ekstrakcijskog pufera (0.3% (w/v) tiobarbiturna kiselina, TBA u 10% (w/v) trikloroctenoj kiselini, TCA). Dobivene ekstrakte preliha sam u tubice i koristila za određivanje sadržaja malondialdehida (MDA).

### **3.2.5. Određivanje sadržaja malondialdehida (MDA)**

Razinu lipidne peroksidacije odredila sam mjerenjem sadržaja malondialdehida (MDA), najučestalijeg produkta koji nastaje tijekom oštećenja lipida u stanici. Ekstrakte, koje sam pripremila prema opisu u poglavlju 3.2.4., zatim sam zagrijavała u termomikseru 30 min na 95°C, a zatim naglo ohladila na ledu (5 min). Prilikom zagrijavanja reakcijske smjese pri niskom pH dolazi do raspadanja lipidnih peroksida nastalih kao posljedica stresa, pri čemu nastaje MDA. Molekula MDA reagira s dvije molekule TBA, što za posljedicu ima nastajanje crvenkastog kromogena kojemu se mjeri apsorbancija (Heath i Parker, 1968). Uzorke sam centrifugirala 15 min na 8000 rpm pri 4°C. Odvojila sam supernatant i izmjerila apsorbanciju na 532 nm i 600 nm. Apsorbancija na 600 nm mjeri se zbog korekcije za nespecifično zamućenje. Kao slijepu probu koristila sam 200 µL 0.1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7.0 i 1300 µL reakcijske smjese (0.3% TBA u 10% TCA). Sadržaj MDA odredila sam prema jednadžbi:



$$\text{Sadržaj MDA} = \frac{A_{532} - A_{600}}{m \times \varepsilon \times l} \quad [\mu\text{mol g}^{-1} \text{ svježe tvari}]$$

gdje je:

$A_{532}$  - apsorbancija izmjerena na 532 nm

$A_{600}$  - apsorbancija izmjerena na 600 nm

$m$  - masa tkiva (g)

$\varepsilon$  - molarni apsorpcijski koeficijent ( $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$l$  - duljina optičkog puta (1cm)

Sadržaj MDA izrazila sam u jedinici  $\mu\text{mol g}^{-1}$  svježe tvari.

### 3.2.6. Određivanje sadržaja proteinskih karbonila

Metoda određivanja sadržaja karbonila prema Levinu i sur. (1994) temelji se na reakciji karbonilnih skupina s dinitrofenilhidrazinom (DNPH), a mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 370 nm. U alikvot proteinskog ekstrakta od 200  $\mu\text{L}$  dodala sam 300  $\mu\text{L}$  otopine DNPH u 2 M HCl za cijepanje proteina. Kao slijepu probu koristila sam alikvot od 200  $\mu\text{L}$  istog proteinskog uzorka i 300  $\mu\text{L}$  2 M HCl. Smjesa je inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi u mraku, uz povremeno potresanje. Nakon inkubacije u smjesu sam dodala 500  $\mu\text{L}$  10%-tne (w/v) TCA za precipitaciju proteina. Uzorci su se hladili 5 min na  $-20^\circ\text{C}$ , a zatim sam ih centrifugirala 10 min na 14000 rpm pri  $4^\circ\text{C}$ . Dobiveni talog isprala sam s 1500  $\mu\text{L}$  smjese etanol/etilacetat (u omjeru 1:1) kako bi se uklonio nevezani reagens. Potom sam, vorteksiranjem, otopila taloge u 1 mL 6 M otopine ureje pripremljene u 20 mM kalij-fosfatnom puferu pH 2.4. Sadržaj karbonila odredila sam prema jednadžbi:

$$\text{Sadržaj karbonila} = \frac{A_{370}}{m \times \varepsilon \times l} \quad [\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteina}]$$

gdje je:

$A_{370}$  - apsorbancija izmjerena na 370 nm

$m$  - koncentracija proteina ( $\text{mg}_{\text{proteina}} \text{ mL}^{-1}$ )

$\varepsilon$  - molarni apsorpcijski koeficijent ( $22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$l$  - duljina optičkog puta (1 cm).

Sadržaj karbonila izrazila sam u jedinici  $\mu\text{mol mg}^{-1}$  proteina.

### 3.2.7. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima

#### 3.2.7.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Reakcijska smjesa koju sam koristila za određivanje aktivnosti CAT sadrži 0.1 M kalij-fosfatni pufer pH 7.0 i 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koji se dodaje neposredno prije korištenja (Aebi, 1984). U 950 µL reakcijske smjese dodala sam 50 µL proteinskog ekstrakta i mjerila smanjenje apsorbancije svakih 10 s tijekom 2 min na valnoj duljini od 240 nm. Kao slijepu probu koristila sam 0.1 M kalij-fosfatni pufer pH 7.0. Aktivnost katalaze odredila sam prema jednadžbama:

$$CAT = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 6 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uz.} \times \varepsilon \times l} \quad [\text{mmol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}]$$

$$CAT = \frac{\Delta A \text{ mmol/ min mL}}{\text{mg proteina/mL}} \quad [\text{mmol}_{\text{produkta}} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}_{\text{proteina}}]$$

gdje je:

$\Delta A_{s.v.}$  – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 240 nm u 10 s

6 - faktor korekcije  $\Delta A_{s.v.}$  za izražavanje rezultata u minuti

$V_{r.s.}$  – volumen reakcijske smjese (1mL)

$F.R.$  – faktor razrjeđenja uzorka (1)

$V_{uz.}$  – volumen uzorka (50 µL)

$\varepsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent (40 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)

$l$  – duljina optičkog puta (1 cm)

Aktivnost CAT izrazila sam u jedinici mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteina.

#### 3.2.7.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze (PPX)

Za određivanje aktivnosti PPX dodala sam 50 µL proteinskog ekstrakta u 950 µL reakcijske smjese koja se sastoji od 0.1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7.0, 20 mM pirogalola te 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dodanog u smjesu neposredno prije mjerenja (Chance i Maehly, 1955). Aktivnost PPX odredila sam mjereći porast apsorbancije svakih 15 s tijekom 1 min na valnoj duljini od 430 nm. Kao slijepu probu koristila sam 0.1 M kalij-fosfatni pufer pH 7.0. Aktivnost PPX izrazila sam prema jednadžbama:

$$PPX = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 4 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uz.} \times \varepsilon \times l} \quad [\mu\text{mol min}^{-1}\text{mL}^{-1}]$$

$$PPX = \frac{\Delta A \mu\text{mol} / \text{min mL}}{\text{mg}_{\text{proteina}} / \text{mL}} \quad [\mu\text{mol}_{\text{produkta}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}]$$

gdje je:

$\Delta A_{s.v.}$  - srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 430 nm u 15 s

4 - faktor korekcije  $\Delta A_{s.v.}$  za izražavanje rezultata u minuti

$V_{r.s.}$  - volumen reakcijske smjese (1mL)

$F.R.$  - faktor razrjeđenja uzorka (1)

$V_{uz.}$  - volumen uzorka (50  $\mu\text{L}$ )

$\varepsilon$  - molarni apsorpcijski koeficijent ( $2.47 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

$l$  - duljina optičkog puta (1 cm).

Aktivnost PPX izrazila sam u jedinici  $\mu\text{mol}_{\text{produkta}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}$ .

### 3.2.7.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze (APX)

Reakcijska otopina koju sam koristila sastoji se od 800  $\mu\text{L}$  pufera (0.1 M kalij-fosfatni pufer pH 7.0 + 10 mM EDTA), 180  $\mu\text{L}$  proteinskog ekstrakta, 10  $\mu\text{L}$  10 mM askorbinske kiseline i 10  $\mu\text{L}$  12 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Nakano i Asada 1981). Zbog oksidacije askorbinske kiseline aktivnost APX odredila sam mjereći pad apsorbancije na valnoj duljini od 290 nm. Kao slijepu probu koristila sam 0.1 M kalij-fosfatni pufer pH 7.0. Aktivnost APX odredila sam prema jednadžbama:

$$APX = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 4 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uz.} \times \varepsilon \times l} \quad [\mu\text{mol min}^{-1}\text{mL}^{-1}]$$

$$APX = \frac{\Delta A_{\mu\text{mol}} / \text{min mL}}{\text{mg}_{\text{proteina}} / \text{mL}} \quad [\mu\text{mol}_{\text{produkta}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}]$$

gdje je:

$\Delta A_{s.v.}$  - srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 290 nm u 15 s

4 - faktor korekcije  $\Delta A_{s.v.}$  za izražavanje rezultata u minuti

$V_{r.s.}$  - volumen reakcijske smjese (1mL)

$F.R.$  - faktor razrjeđenja uzorka (1)

$V_{uz.}$  - volumen uzorka (180  $\mu\text{L}$ )

$\varepsilon$  - molarni apsorpcijski koeficijent ( $2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

$l$  - duljina optičkog puta (1 cm).

Aktivnost APX izrazila sam u jedinici  $\mu\text{mol}_{\text{produkta}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}$ .

### 3.2.8. Razdvajanje proteina nativnom poliakrilamid gel elektroforezom (PAGE)

U proteinske uzorke koje sam nanosila na gel prethodno sam dodala kap mješavine boje bromfenol plavo i saharoze kako bi uzorci dobili na težini i pali na dno jažice te kako bih mogla pratiti tijek elektroforeze. Nativnom PAGE osigurano je da proteini zadrže svoju aktivnost, očuvaju izoforme i interakcije među proteinskim podjedinicama. Prema podacima iz Tablice 4. pripremila sam 10%-tni gel za razdvajanje i 4%-tni gel za koncentriranje. Proteini su razdvajani vertikalnom diskontinuiranom PAG - elektroforezom u konstantnim uvjetima: napon od 100 V prvih 45 min (za koncentriranje uzoraka u gornjem gelu za sabijanje), a ostatak na 220 V pri 4°C uz kontinuirano hlađenje vodom (Balen i sur., 2011a). Na gel sam nanosila 100  $\mu\text{g}$  proteina po jažici.

**Tablica 4.** Sastav gela za elektroforezu u nativnim uvjetima

	gel za razdvajanje (10%)	gel za koncentriranje (4%)
reH <sub>2</sub> O	16.8 mL	6.1 mL
Tris-HCl	1.5 M, pH 8.8, 10 mL	0.5 M, pH 6.8, 2.5 mL
Akrilamid/Bisakrilamid	13.2 mL	1.3 mL
10% amonijev peroksodisulfat (APS)	200 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
tetrametiletilendiamin (TEMED)	20 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$

### **3.2.9. Određivanje aktivnosti i broja izoformi antioksidacijskih enzima u gelu**

#### **3.2.9.1. Određivanje aktivnosti i broja izoformi katalaze u gelu**

Za detekciju aktivnosti i broja izoformi CAT gelove sam inkubirala 45 min (3 x 15 min) u destiliranoj vodi, zatim 10 min u 5 mM vodenoj otopini  $H_2O_2$ . Potom sam kratko isprala gelove u destiliranoj vodi te ih bojala 10 min u otopini  $FeCl_3$  i  $K_3Fe(CN)_6$ , u omjeru 1:1 (Woodbury i sur., 1971). Inkubacija je trajala 1 h, dok se nisu pojavile žute vrpce na tamnozelenoj podlozi koje predstavljaju izoforme CAT.

#### **3.2.9.2. Određivanje aktivnosti i broja izoformi pirogalol peroksidaze u gelu**

Za detekciju aktivnosti i broja izoformi PPX, prema protokolu Chance i Maehly (1955) inkubirala sam gelove 30 min u 0.1 M kalij-fosfatnom puferu pH 7.0, nakon toga 20 min u 0.1 M kalij-fosfatnom puferu pH 7.0 koji sadrži 20 mM pirogalol i 4 mM  $H_2O_2$ . Nakon 5-10 min pojavile su se smeđe vrpce koje ukazuju na položaj izoformi PPX u gelu.

#### **3.2.9.3. Određivanje aktivnosti i broja izoformi askorbat peroksidaze u gelu**

Detekciju aktivnosti i broja izoformi APX provela sam inkubirajući gelove 30 min (3 x 10 min) u 0.1 M kalij-fosfatnom puferu pH 7.0 koji sadrži 20 mM askorbinsku kiselinu, zatim 20 min u 0.1 M kalij-fosfatnom puferu pH 7.0 koji sadrži 4 mM askorbinsku kiselinu i 2 mM  $H_2O_2$ . Slijedilo je kratko ispiranje u 0.1 M kalij-fosfatnom puferu pH 7.0, a potom inkubacija od 15 min u 0.1 M kalij-fosfatnom puferu pH 7.8 koji sadrži 2.45 mM nitroblue tetrazolium (NBT) i 28 mM tetrametiletilendiamin (TEMED) (Mittler i Zilinskas, 1993). Nakon bojanja, izoforme APX pojavile su se u obliku bezbojnih vrpce na plavoljubičastoj podlozi.

### **3.3. Statistička obrada podataka**

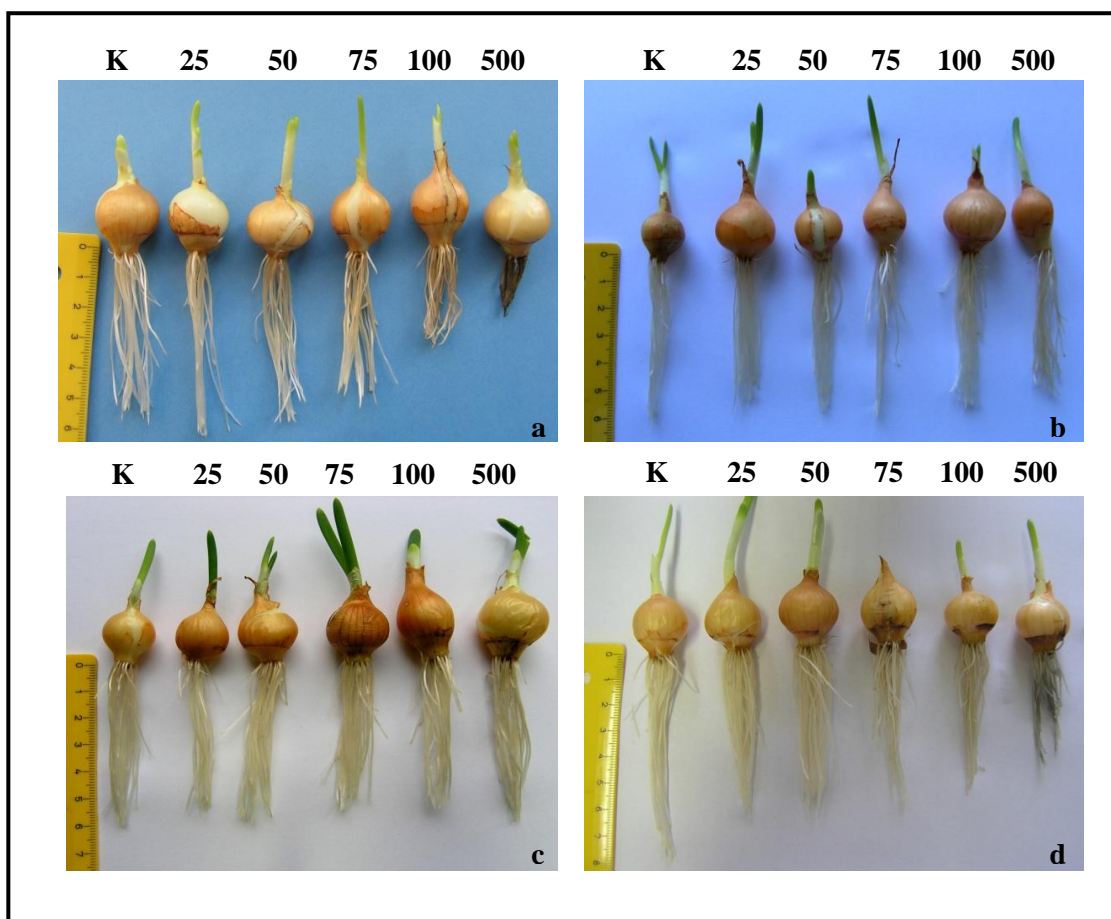
Svi dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška od dvanaest replika. Podatke sam statistički obradila računalnim programom Statistica 8.0 za analizu varijance (one-way ANOVA), nakon čega sam provela post-hoc Duncan test. Pri tumačenju statistički obrađenih rezultata značajnom sam smatrala razliku  $p \leq 0.05$ .

REZULTATI

## 4. REZULTATI

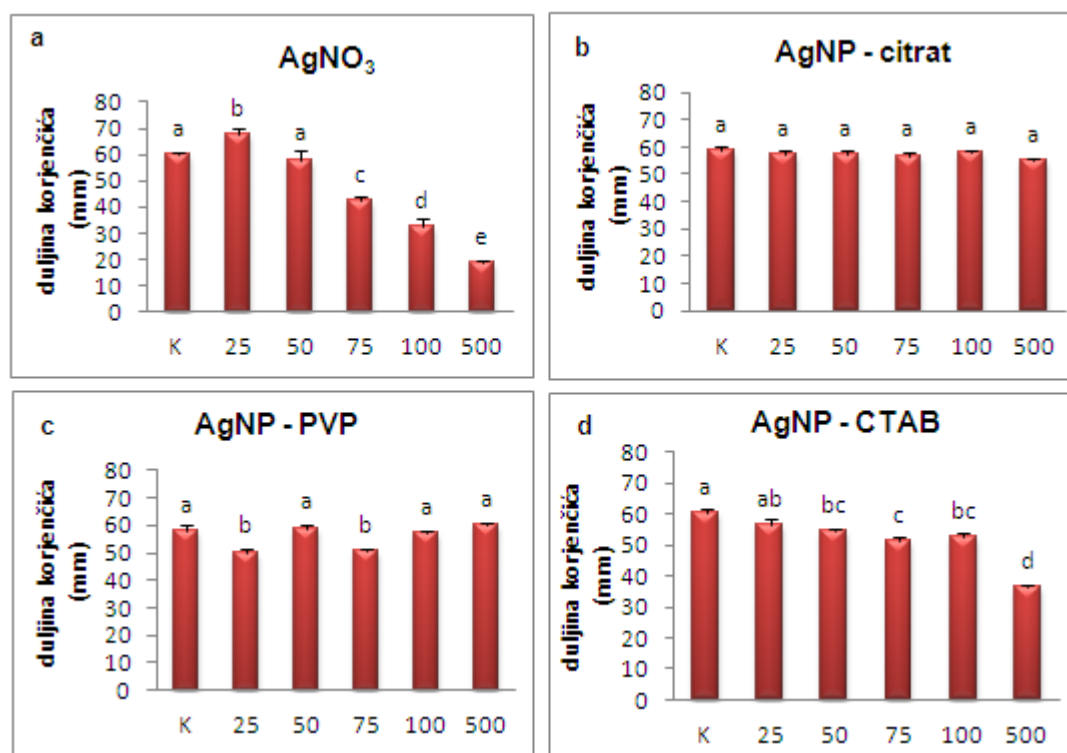
### 4.1. Morfometrija

Na Slici 2. prikazani su korjenčići luka *A. cepa* tretirani ionskim srebrom ( $\text{AgNO}_3$ ) te nanočesticama srebra (AgNP) stabiliziranih trima različitim omotačima- (AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNP-CTAB), u trajanju od 72 h. Na slici je vidljivo da su veće koncentracije (100  $\mu\text{M}$  i 500  $\mu\text{M}$ ) ionskog srebra (Slika 2a) snažnije inhibirale rast korjenčića u odnosu na čestice nanosrebra primijenjene u istim koncentracijama (Slika 2 b, c i d). Ionsko srebro primijenjeno u koncentraciji od 500  $\mu\text{M}$  jako je oštetilo tkivo korjenčića luka, što je bilo vidljivo i iz duljine korjenčića, ali i zbog tamnog obojenja (Slika 2a).



**Slika 2.** Lukovice s korjenčićima *A. cepa* nakon 72-satnog tretmana: a)  $\text{AgNO}_3$ , b) AgNP-citrat, c) AgNP-PVP, d) AgNP-CTAB. K – kontrola, 25 – 25  $\mu\text{M}$ , 50 – 50  $\mu\text{M}$ , 75 – 75  $\mu\text{M}$ , 100 – 100  $\mu\text{M}$ , 500 – 500  $\mu\text{M}$ .

Prosječna duljina korjenčića, odnosno inhibicija rasta korjenčića prvi je pokazatelj na temelju kojeg možemo procijeniti utječu li određene koncentracije ionskog ili nanosrebra na njegov rast. Slika 3. pokazuje prosječne duljine korjenčića *A. cepa*, izmjerene u mm ovisno o tretmanu i koncentraciji. Sve primijenjene koncentracije ionskog srebra (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 100  $\mu$ M i 500  $\mu$ M) pokazale su učinak na rast korjenčića u usporedbi s kontrolom (Slika 3a). Koncentracije 75  $\mu$ M, 100  $\mu$ M i 500  $\mu$ M imale su inhibirajući učinak na rast korjenčića koji se statistički značajno povećavao s porastom koncentracije ionskog srebra, dok je 25  $\mu$ M  $\text{AgNO}_3$  poticao njihov rast (Slika 3a). Nakon tretmana nanočesticama AgNP-citrat nisam uočila učinak primijenjenih koncentracija na rast korjenčića (Slika 3b). Nanočestice AgNP-PVP koncentracije 25  $\mu$ M i 75  $\mu$ M statistički su značajno inhibirale rast korjenčića u usporedbi s kontrolom (Slika 3c). Sve ispitane koncentracije nanosrebra AgNP-CTAB, osim najmanje (25  $\mu$ M) značajno su inhibirale rast korjenčića u usporedbi s kontrolom, a učinak je bio najjače izražen nakon izlaganja najvećoj koncentraciji (Slika 3d).

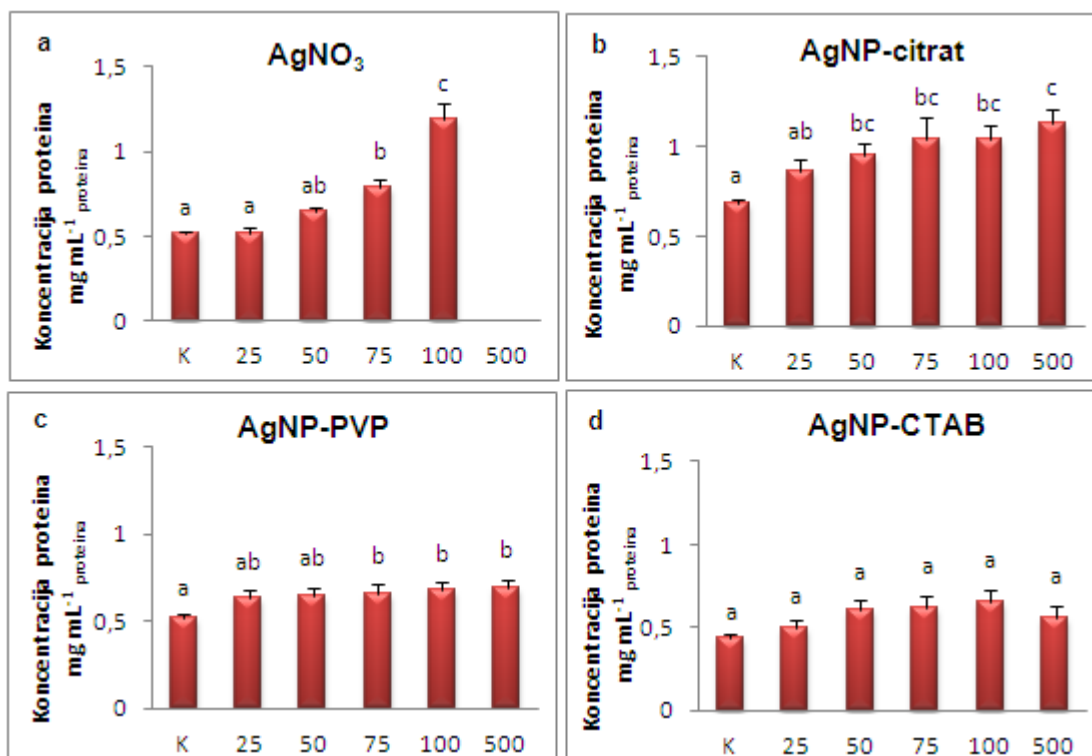


**Slika 3.** Prosječna duljina korjenčića *A. cepa* nakon 72-satnog tretmana: a)  $\text{AgNO}_3$ , b) AgNP-citrat, c) AgNP-PVP, d) AgNP-CTAB. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti 12 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se značajno razlikuju ( $p \leq 0.05$ , Duncan test). K – kontrola, 25 – 25  $\mu$ M, 50 – 50  $\mu$ M, 75 – 75  $\mu$ M, 100 – 100  $\mu$ M, 500 – 500  $\mu$ M.



## 4.2. Koncentracija proteina

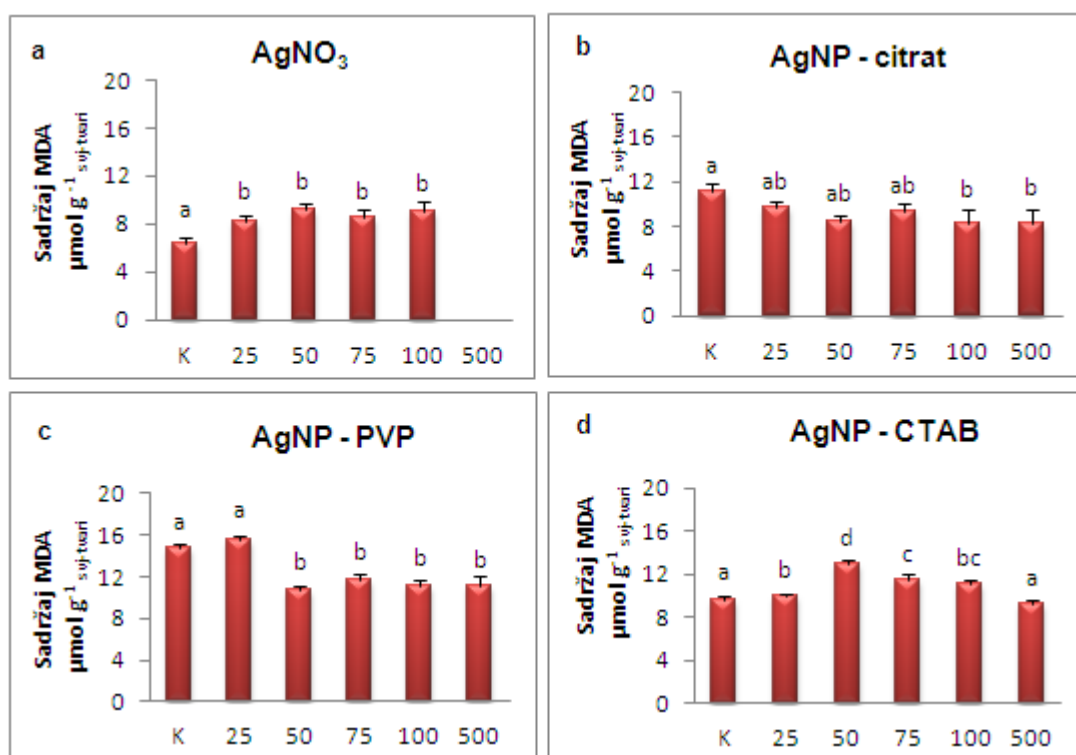
Na Slici 4. prikazane su koncentracije proteina izmjerene u ekstraktima korjenčića luka. Statistički značajan porast koncentracije proteina u odnosu na kontrolu zamijetila sam nakon tretmana ionskim srebrom u koncentraciji od 75 i 100  $\mu\text{M}$ , dok niže koncentracije nisu rezultirale statistički značajnim povećanjem; nakon tretmana 500  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  koncentraciju proteina nisam mogla izmjeriti (Slika 4a). Nakon tretmana nanosrebrom AgNP-citrat koncentracija proteina bila je značajno povećana u svim ispitanim koncentracijama u odnosu na kontrolu, osim tretmana 25  $\mu\text{M}$  AgNP-citrat (Slika 4b). Korjenčići koji su bili uronjeni u otopinu nanosrebra AgNP-PVP statistički značajan porast koncentracije proteina u usporedbi s kontrolom pokazali su nakon izlaganja 75, 100 i 500  $\mu\text{M}$  AgNP-PVP (Slika 4c), dok tretmani korjenčića nanosrebrom AgNP-CTAB nisu doveli do promjene koncentracije proteina u odnosu na kontrolne uzorke (Slika 4d).



**Slika 4.** Koncentracija proteina u korjenčićima *A. cepa* nakon 72-satnog tretmana: a)  $\text{AgNO}_3$ , b) AgNP-citrat, c) AgNP-PVP i d) AgNP-CTAB. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti 12 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se značajno razlikuju ( $p \leq 0.05$ , Duncan test). K – kontrola, 25 – 25  $\mu\text{M}$ , 50 – 50  $\mu\text{M}$ , 75 – 75  $\mu\text{M}$ , 100 – 100  $\mu\text{M}$ , 500 – 500  $\mu\text{M}$ .

### 4.3. Sadržaj MDA

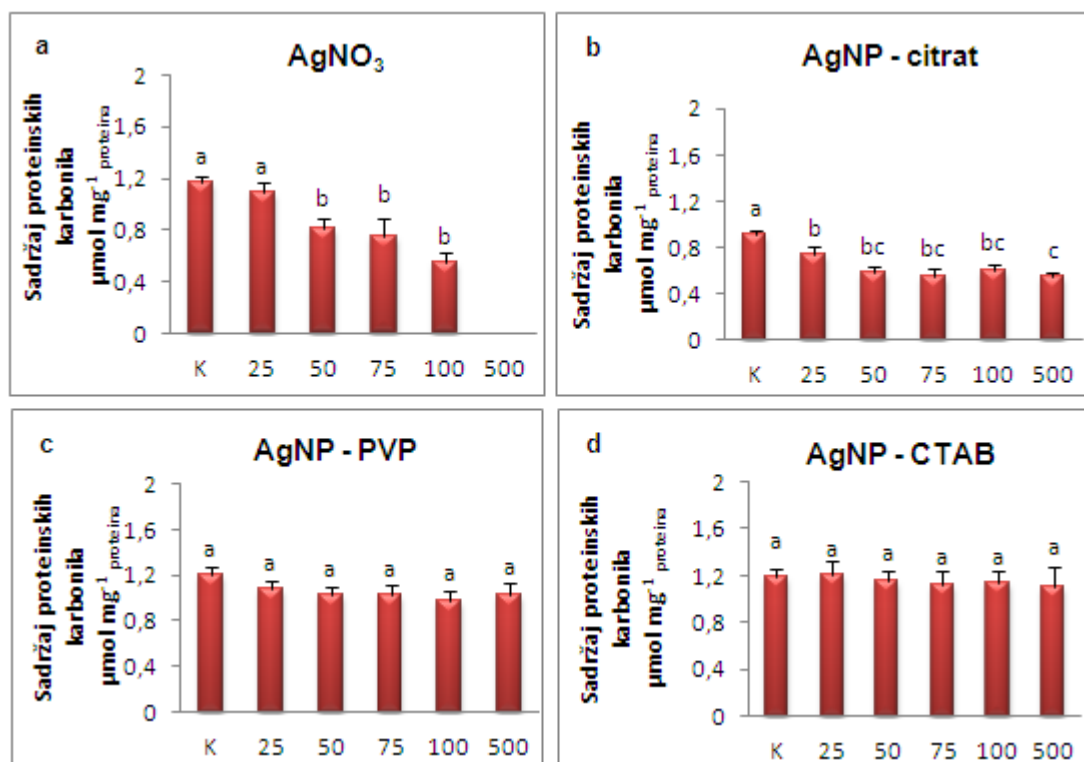
Razina lipidne peroksidacije u korjenčićima luka izmjerena je preko sadržaja malondialdehida (MDA). Na Slici 5. prikazani su rezultati nakon tretmana u trajanju od 72 h. Ionsko srebro primijenjeno u svim ispitanim koncentracijama izazvalo je značajno povećanje razine lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu, iako vrijednosti između tretmana nisu bile statistički različite (Slika 5a). Nanočestice AgNP-citrat primijenjene u koncentracijama od 100  $\mu\text{M}$  i 500  $\mu\text{M}$  izazvale su smanjenje sadržaja MDA u korjenčićima lukovicama u usporedbi s kontrolom, dok učinak ostalih koncentracija na sadržaj MDA nije bio statistički značajan (Slika 5b). Značajno smanjenje lipidne peroksidacije izazvale su 50, 75, 100 i 500  $\mu\text{M}$  koncentracije nanosrebra AgNP-PVP u odnosu na kontrolne uzorke (Slika 5c). Korjenčići tretirani 25, 50, 75 i 100  $\mu\text{M}$  nanočesticama AgNP-CTAB pokazali su povišeni sadržaj MDA u odnosu na kontrolu, dok 500  $\mu\text{M}$  koncentracija nije izazvala značajnu razliku (Slika 5d).



**Slika 5.** Sadržaj MDA u korjenčićima *A. cepa* nakon 72-satnog tretmana: a) AgNO<sub>3</sub>, b) AgNP-citrat, c) AgNP-PVP i d) AgNP-CTAB. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti 12 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se značajno razlikuju ( $p \leq 0.05$ , Duncan test). K – kontrola, 25 – 25  $\mu\text{M}$ , 50 – 50  $\mu\text{M}$ , 75 – 75  $\mu\text{M}$ , 100 – 100  $\mu\text{M}$ , 500 – 500  $\mu\text{M}$ .

#### 4.4. Sadržaj proteinskih karbonila

Statistička obrada podataka dobivenih rezultata ukazuje na neke promjene u sadržaju karbonila uzrokovane tretmanima ionskim srebrom, odnosno nanočesticama srebra, AgNP-citratom, AgNP-PVP i AgNP-CTAB, tijekom 72 h (Slika 6). Sadržaj karbonila u korjenčićima tretiranim 50, 75 i 100  $\mu\text{M}$  AgNO<sub>3</sub> značajno je smanjen u odnosu na kontrolne uzorke i uzorke tretirane 25  $\mu\text{M}$  AgNO<sub>3</sub> (Slika 6a). U korjenčićima izloženim 500  $\mu\text{M}$  AgNO<sub>3</sub> nije bilo moguće izmjeriti sadržaj karbonila jer je tkivo korjenčića bilo jako oštećeno (Slika 6a). Sve ispitane koncentracije nanosrebra AgNP-citrat izazvale su smanjenje sadržaja karbonila, a najmanji sadržaj zabilježila sam pri najvećoj ispitanoj koncentraciji od 500  $\mu\text{M}$  (Slika 6b). Tretmani nanosrebrom AgNP-PVP i AgNP-CTAB nisu pokazali značajne promjene u sadržaju karbonila u korjenčićima luka u odnosu na kontrole (Slika 6c i d).

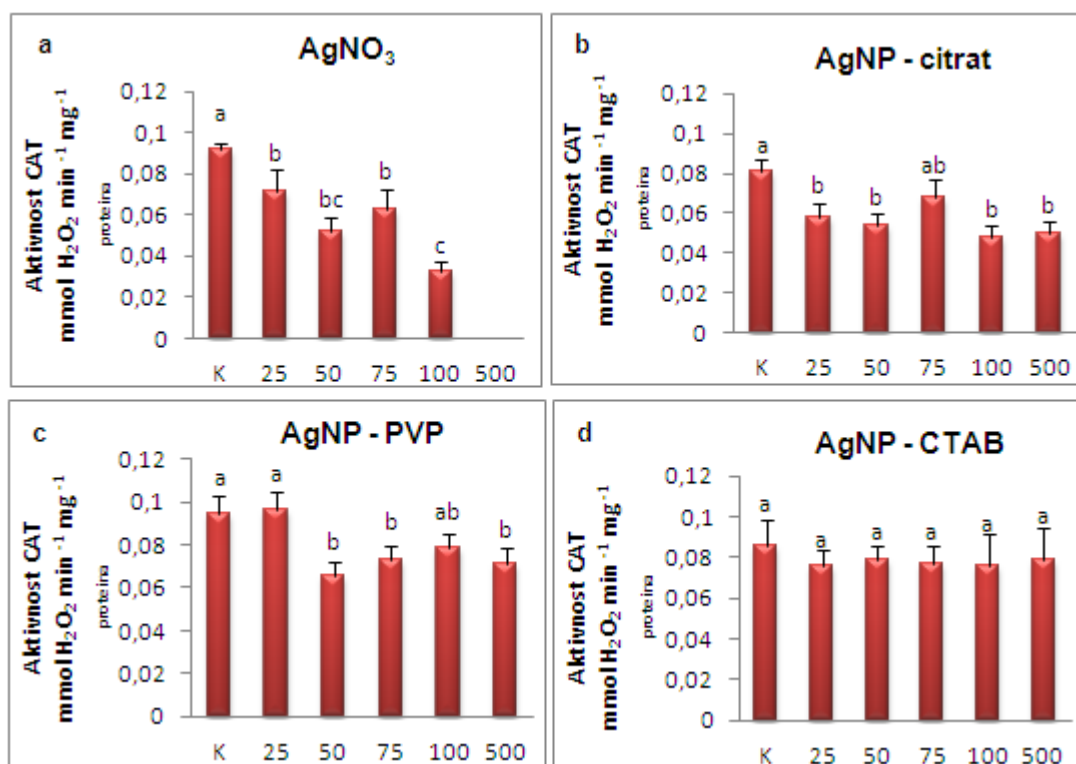


**Slika 6.** Sadržaj proteinskih karbonila u korjenčićima *A. cepa* nakon 72-satnog tretmana: a) AgNO<sub>3</sub>, b) AgNP-citrat, c) AgNP-PVP i d) AgNP-CTAB. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti 12 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se značajno razlikuju ( $p < 0.05$ , Duncan test). K – kontrola, 25 – 25  $\mu\text{M}$ , 50 – 50  $\mu\text{M}$ , 75 – 75  $\mu\text{M}$ , 100 – 100  $\mu\text{M}$ , 500 – 500  $\mu\text{M}$ .

## 4.5. Aktivnost antioksidacijskih enzima

### 4.5.1. Aktivnost katalaze (CAT)

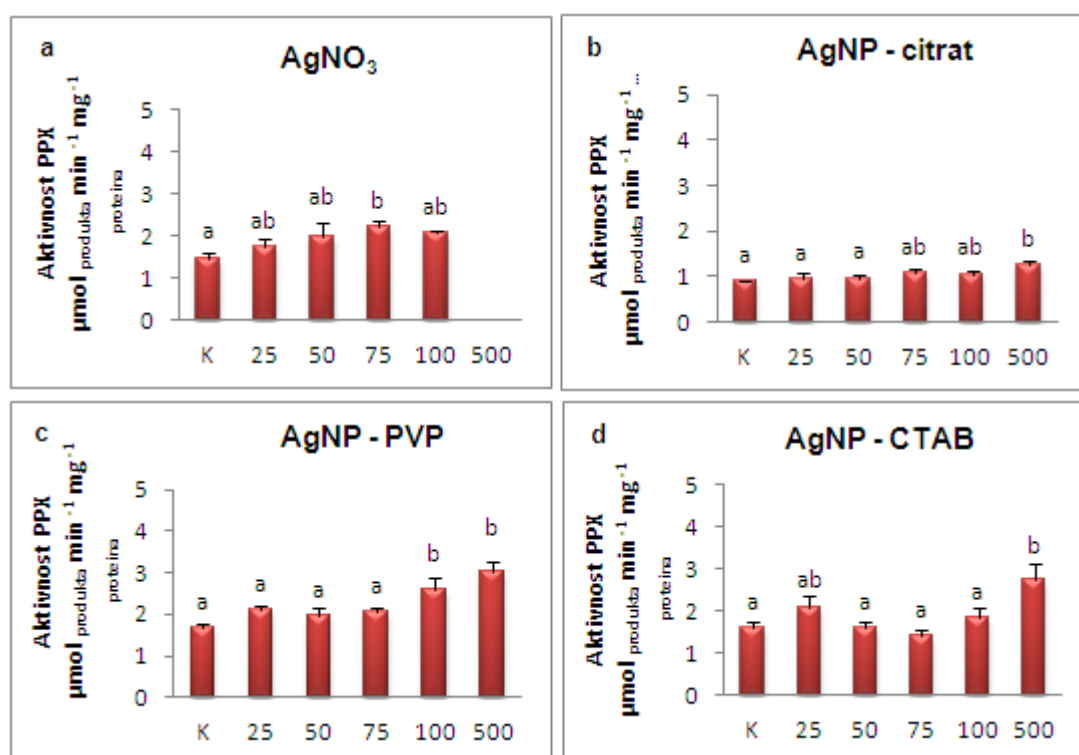
Spektrofotometrijski izmjerena aktivnost katalaze u korjenčićima lukovica smanjena je nakon tretmana  $\text{AgNO}_3$  pri svim ispitanim koncentracijama (25, 50, 75 i 100  $\mu\text{M}$ ) u odnosu na kontrolne uzorke, dok aktivnost nije bilo moguće izmjeriti u tkivu izloženom 500  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  (Slika 7a). Najveće smanjenje aktivnosti enzima zabilježila sam nakon izlaganja 100  $\mu\text{M}$  ionskom srebru (Slika 7a). Korjenčići tretirani 25, 50, 100 i 500  $\mu\text{M}$  nanosrebrom AgNP-citrat pokazali su značajno smanjenu aktivnost enzima u odnosu na kontrolne uzorke, dok je nakon izlaganja 75  $\mu\text{M}$  AgNP-citrat zabilježena smanjena vrijednost u usporedbi s kontrolom, ali razlika nije bila statistički značajna (Slika 7b). U korjenčićima tretiranim nanočesticama AgNP-PVP koncentracije 50, 75, 100 i 500  $\mu\text{M}$  izmjerena je značajno snižena aktivnost katalaze u odnosu na kontrolu (Slika 7c), dok tretmani s AgNP-CTAB nisu pokazali nikakvu razliku u aktivnosti enzima u usporedbi s kontrolnim uzorcima (Slika 7d).



**Slika 7.** Aktivnost katalaze izmjerena u korjenčićima *A. cepa* nakon 72-satnog tretmana: a)  $\text{AgNO}_3$ , b) AgNP-citrat, c) AgNP-PVP i d) AgNP-CTAB. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti 12 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se značajno razlikuju ( $p \leq 0.05$ , Duncan test). K – kontrola, 25 – 25  $\mu\text{M}$ , 50 – 50  $\mu\text{M}$ , 75 – 75  $\mu\text{M}$ , 100 – 100  $\mu\text{M}$ , 500 – 500  $\mu\text{M}$ .

#### 4.5.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze (PPX)

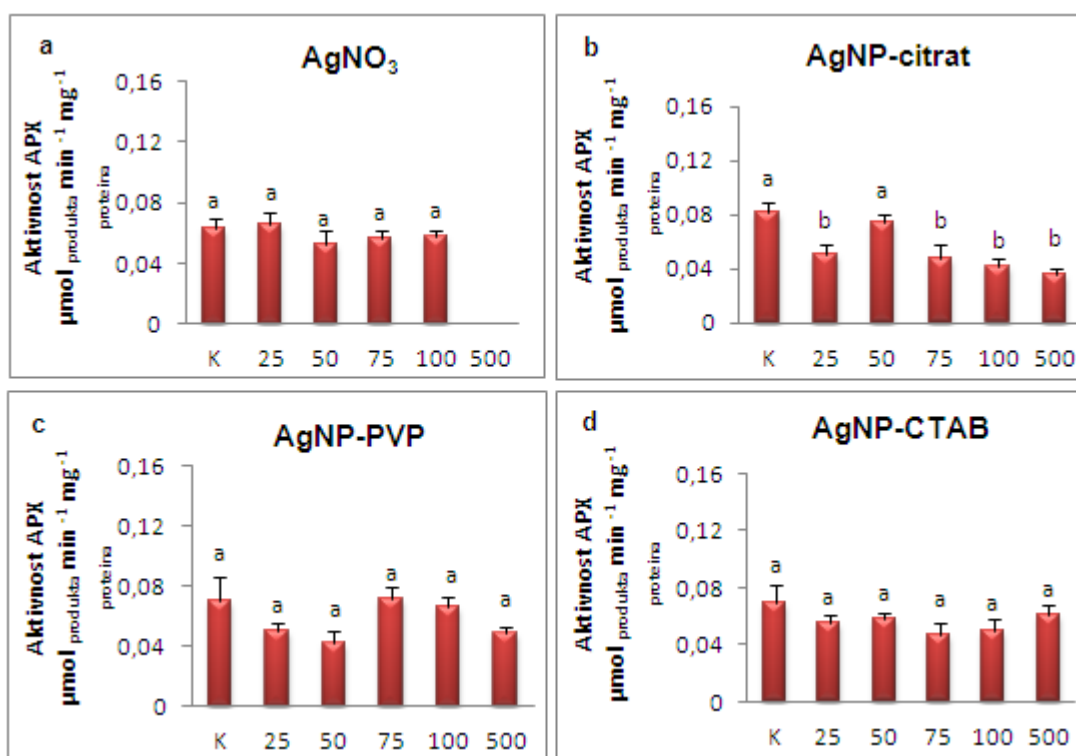
Tretiranje korjenčića luka ionskim srebrom rezultiralo je porastom aktivnosti pirogalol peroksidaze pri gotovo svim tretmanima, iako je samo nakon izlaganja 75  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  dobivena statistički značajna vrijednost u odnosu na kontrolu; pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji (500  $\mu\text{M}$ ) nije izmjerena aktivnost enzima (Slika 8a). Povećanu aktivnost PPX izmjerila sam pri najvećim koncentracijama svih tretmana nanosrebrom (AgNP-citrat, AgNP-PVP, AgNP-CTAB) (Slika 8b, c i d). Izlaganje korjenčića 100  $\mu\text{M}$  nanosrebru AgNP-PVP također je rezultiralo povećanom aktivnošću enzima u usporedbi s kontrolom (Slika 8c).



**Slika 8.** Aktivnost pirogalol peroksidaze izmjerena u korjenčićima *A. cepa* nakon 72-satnog tretmana: a)  $\text{AgNO}_3$ , b) AgNP-citrat, c) AgNP-PVP i d) AgNP-CTAB. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti 12 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se značajno razlikuju ( $p \leq 0.05$ , Duncan test). K – kontrola, 25 – 25  $\mu\text{M}$ , 50 – 50  $\mu\text{M}$ , 75 – 75  $\mu\text{M}$ , 100 – 100  $\mu\text{M}$ , 500 – 500  $\mu\text{M}$ .

#### 4.5.3. Aktivnost askorbat peroksidaze (APX)

Aktivnost APX u korjenčićima luka tretiranim ionskim srebrom statistički se nije razlikovala od kontrolnih uzoraka, a pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji (500  $\mu\text{M}$ ) nije izmjerena aktivnost enzima (Slika 9a). U korjenčićima tretiranim nanosrebrom AgNP-citrat aktivnost enzima smanjena je pri koncentracijama 25, 75, 100 i 500  $\mu\text{M}$  u usporedbi s kontrolom (Slika 9b). Statistički značajnu razliku u aktivnosti APX nije izazvala nijedna primijenjena koncentracija nanosrebra AgNP-PVP (Slika 9c), kao ni AgNP-CTAB (Slika 9d).



**Slika 9.** Aktivnost askorbat peroksidaze izmjerena u korjenčićima *A. cepa* nakon 72-satnog tretmana: a) AgNO<sub>3</sub>, b) AgNP-citrat, c) AgNP-PVP i d) AgNP-CTAB. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti 12 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se značajno razlikuju ( $p \leq 0.05$ , Duncan test). K – kontrola, 25 – 25  $\mu\text{M}$ , 50 – 50  $\mu\text{M}$ , 75 – 75  $\mu\text{M}$ , 100 – 100  $\mu\text{M}$ , 500 – 500  $\mu\text{M}$ .

## **4.6. Aktivnost antioksidacijskih enzima u gelu**

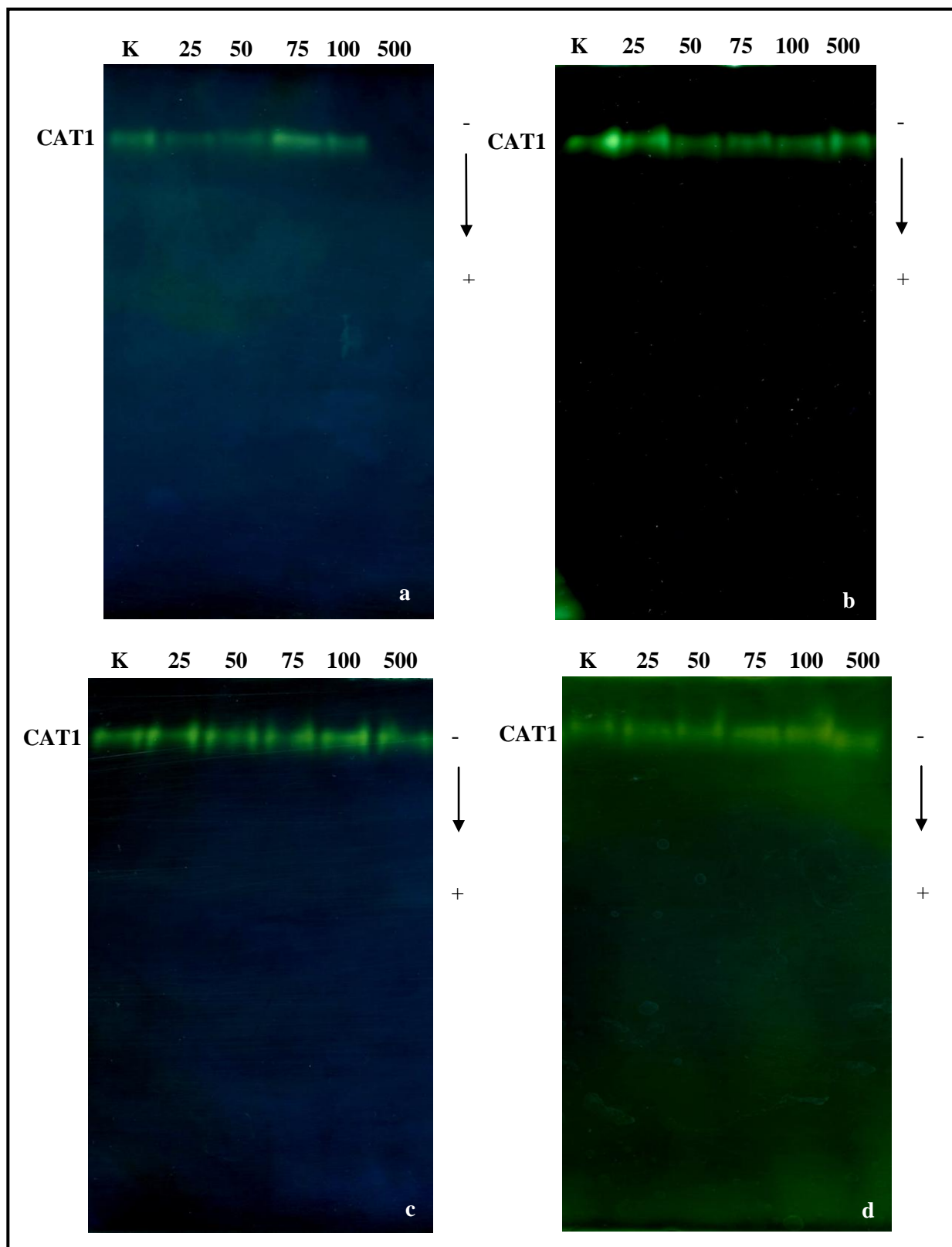
### **4.6.1. Aktivnost katalaze (CAT) u gelu**

Slika 10. pokazuje aktivnost i izoforme katalaze u gelu koje sam dobila razdvajanjem proteina nativnom PAG -elektroforezom. U svim kontrolnim i tretiranim korjenčićima opazila sam samo jednu izoformu katalaze (CAT1, Slika 10a, b, c i d).

U korjenčićima koji su bili uronjeno u otopinu ionskog srebra ( $\text{AgNO}_3$ ) aktivnost katalaze izostala je nakon tretmana najvećom koncentracijom ( $500\ \mu\text{M}$ ), dok je intenzitet obojenja CAT1 postupno slabio u uzorku izloženom  $25\ \mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  prema  $100\ \mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  (Slika 10a).

Intenzitet obojenja CAT1 u korjenčićima tretiranim nanočesticama AgNP-citrat smanjio se pri koncentracijama od 50, 75, 100 i  $500\ \mu\text{M}$  u usporedbi s kontrolom i tretmanom  $25\ \mu\text{M}$  AgNP-citrat (Slika 9b).

Tretmani nanosrebrom AgNP-PVP i AgNP-CTAB nisu pokazali promjene u intenzitetu obojenja izoforme CAT1 u usporedbi s kontrolnim uzorcima (Slika 10c i d).



**Slika 10.** Aktivnost i izoforme katalaze u gelu nakon native PAG elektroforeze dobiveni u korjenčićima *A. cepa* nakon 72-satnog tretmana: a) AgNO<sub>3</sub>, b) AgNP-citrat, c) AgNP-PVP i d) AgNP-CTAB. K – kontrola, 25 – 25 μM, 50 – 50 μM, 75 – 75 μM, 100 – 100 μM, 500 – 500 μM.



#### 4.6.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze (PPX) na gelu

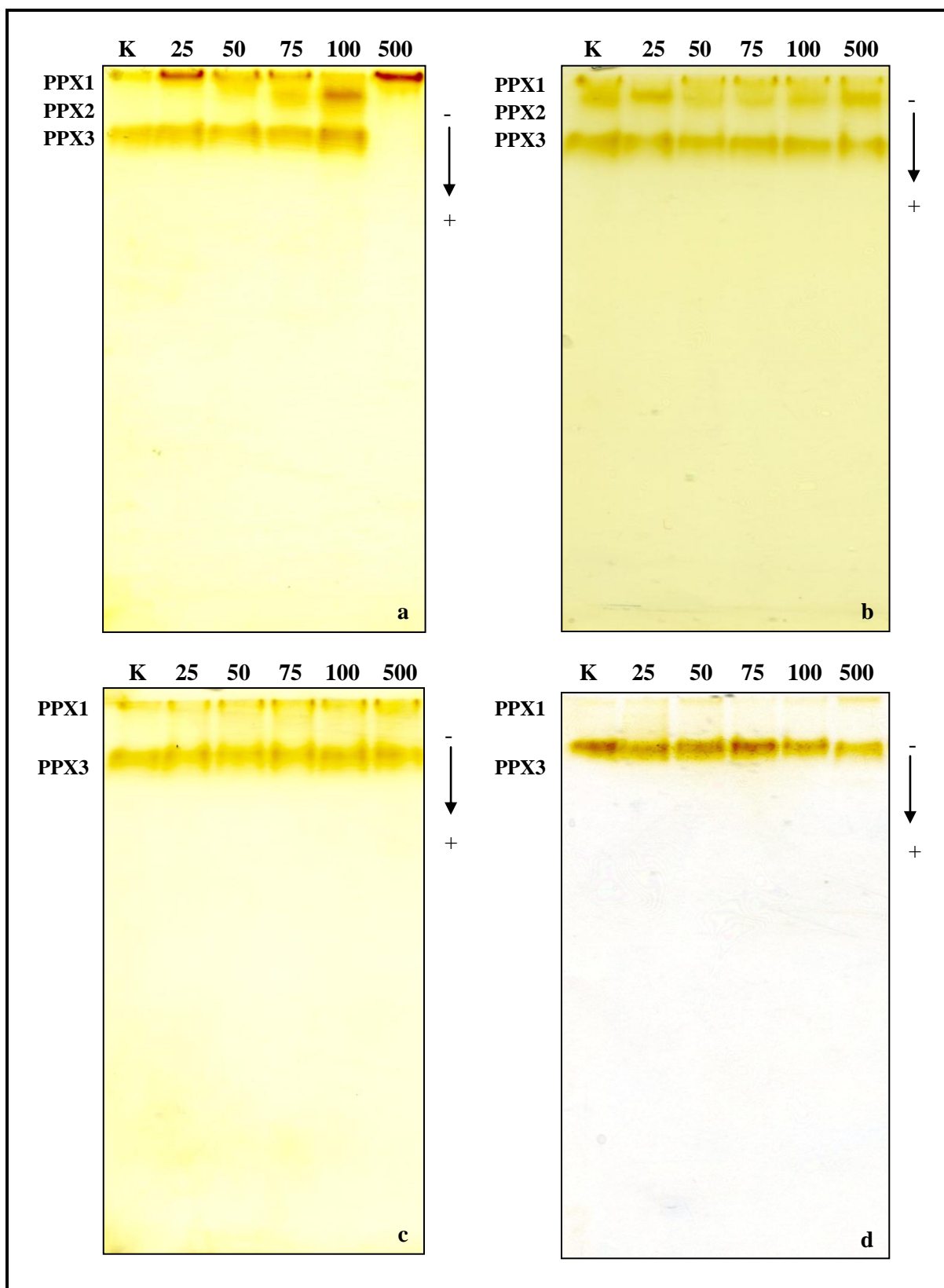
Aktivnosti pirogalol peroksidaze koju sam dobila u gelu prikazana je na Slici 11. U analiziranim korjenčićima opazila sam ukupno tri izoforme pirogalol peroksidaze koje su prema rastućoj pokretljivosti označene kao PPX1, PPX2 i PPX3.

U tretmanima ionskim srebrom za sve uzroke bila je zajednička izoforma PPX1 (Slika 11a). Kontrolni uzorak i tretman 25  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  pokazali su samo dvije izoforme, PPX1 i PPX3, iako je izoenzim PPX1 bio jače izražen u tretmanu u odnosu na kontrolu (Slika 11a). U uzorcima korjenčića izloženima djelovanju 50, 75 i 100  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  opazila sam sve tri izoforme, iako nisu bile jednako izražene u svim tretmanima; izoforma PPX2 bila je slabijeg intenziteta nakon izlaganja 50  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , dok je uzorak tretiran 100  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  pokazao jako izražene izoforme PPX2 i PPX3 (Slika 11a). Intenzitet izoforme PPX2 pojačavao se s povećanjem koncentracija ionskog srebra, a intenzitet PPX3 bio je jednak u svim tretmanima (Slika 11a). U uzorku tretiranom najvećom koncentracijom ionskog srebra (500  $\mu\text{M}$ ) bila je vidljiva samo izoforma PPX1 (Slika 11a).

U korjenčićima tretiranim nanosrebrom AgNP-citrat sve tri izoforme prisutne su u svim primijenjenim koncentracijama, a nisam zamijetila niti razlike u intenzitetu obojenja u izoformama između pojedinih tretmana (Slika 11b).

Izoforme PPX1 i PPX3 bile su prisutne u korjenčićima koji su bili uronjeni u otopine svih ispitanih koncentracija nanosrebra AgNP-PVP, a nisam opazila niti razlike u intenzitetu obojenja PPX1 i PPX3 između različitih tretmana; izoformu PPX2 nisam opazila niti u jednom tretmanu nanočesticama AgNP-PVP (Slika 11c).

U korjenčićima tretiranim nanosrebrom AgNP-CTAB izoforma PPX1 bila je vrlo slabo izražena u svim ispitanim koncentracijama, dok je izoforma PPX3 bila intenzivnog obojenja u svim tretmanima, kao i u kontrolnom uzorku (Slika 11d).



**Slika 11.** Aktivnost i izoforme pirogalol peroksidaze u gelu nakon native PAG elektroforeze dobiveni u korjenčićima *A. cepa* nakon 72-satnog tretmana: a) AgNO<sub>3</sub>, b) AgNP-citrat, c) AgNP-PVP i d) AgNP-CTAB. K – kontrola, 25 – 25  $\mu\text{M}$ , 50 – 50  $\mu\text{M}$ , 75 – 75  $\mu\text{M}$ , 100 – 100  $\mu\text{M}$ , 500 – 500  $\mu\text{M}$ .

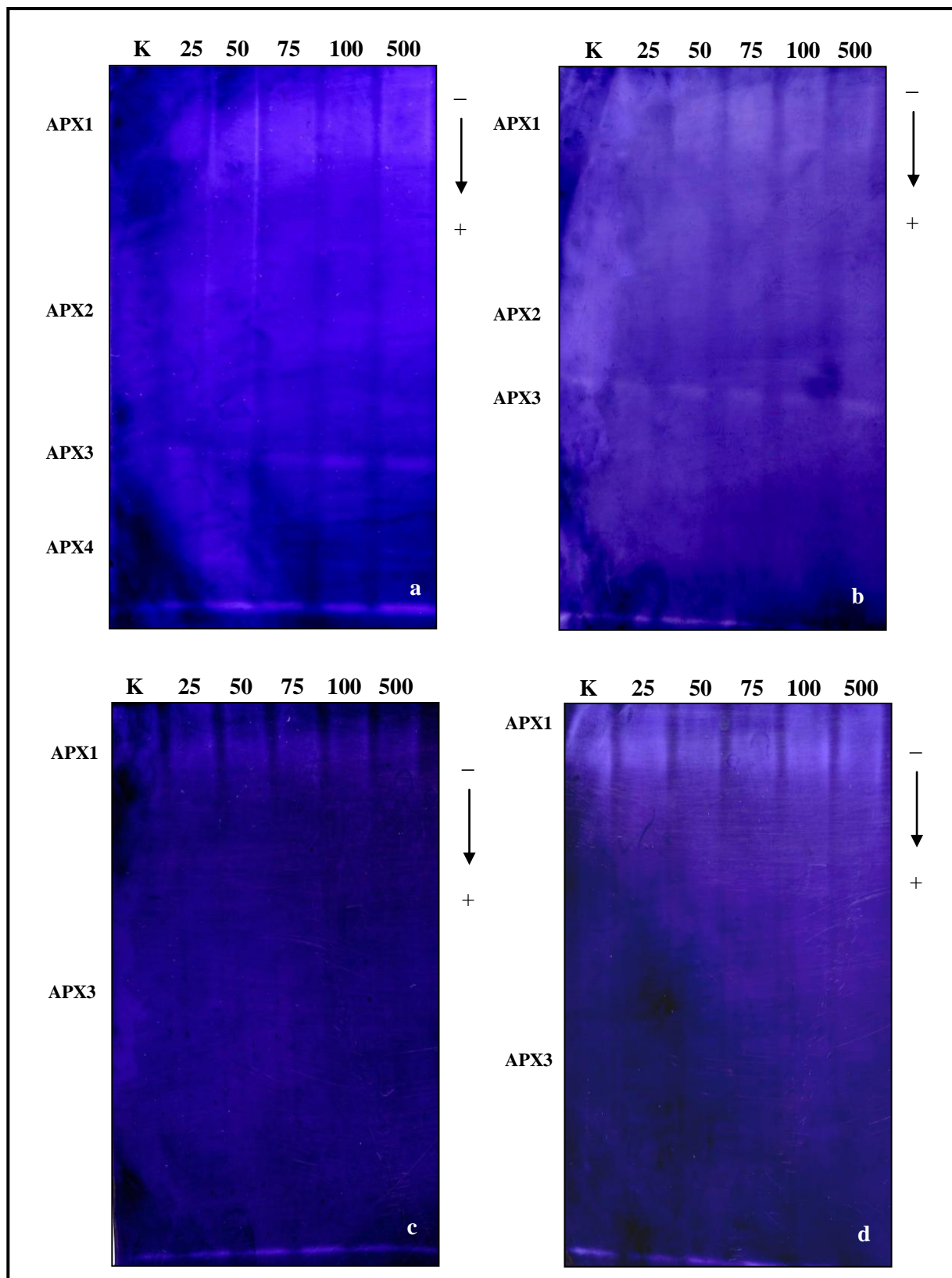
#### 4.6.3. Aktivnost askorbat peroksidaze (APX) na gelu

Na Slici 12. vidljive su proteinske vrpce u gelu koje odgovaraju aktivnosti askorbat peroksidaze. U analiziranim korjenčićima opazila sam četiri izoforme askorbat peroksidaze koje su prema rastućoj pokretljivosti označene kao APX1, APX2, APX3 i APX4.

Slika 12a prikazuje izoforme askorbat peroksidaze koje su dobivene nakon izlaganja korjenčića luka različitim koncentracijama ionskog srebra. Sve četiri izoforme (APX1, APX2, APX3 i APX4) bile su vidljive u korjenčićima luka nakon tretmana ionskim srebrom. U kontrolnom uzorku nisam uočila izoforme APX1 i APX4. Intenzitet izoformi APX1 i APX3 bio je jači u tretmanima nego u kontroli i pojačavao se porastom primijenjenih koncentracija. Ove dvije izoforme bile su izraženije nego izoenzimi APX2 i APX4. Izoforma APX2 bila je najslabijeg intenziteta obojenja u svim ispitanim uzorcima.

U korjenčićima tretiranim nanosrebrom AgNP-citrat uočila sam tri izoforme- APX1, APX2 i APX3, od kojih je APX3 bila najizraženija, a intenzitet joj se povećavao s porastom primijenjenih koncentracija; izoenzim APX2 ponovo je bio najslabijeg intenziteta obojenja u svim ispitanim uzorcima (Slika 12b).

Korjenčići tretirani nanosrebrom AgNP-PVP pokazali su dvije izoforme, APX1 i APX3, koje su bile jače izražene u tretmanima u odnosu na kontrolni uzorak; izoenzim APX3 bio je jačeg intenziteta obojenja u usporedbi s APX1 (Slika 12c). Analizom aktivnosti i izoformi askorbat peroksidaze u gelu u korjenčićima koji su izloženi djelovanju nanosrebra AgNP-CTAB dobila sam isti rezultat kao i nakon tretmana nanočesticama AgNP-PVP (Slika 12c i d).



**Slika 12.** Aktivnost i izoforme askorbat peroksidaze u gelu nakon native PAG elektroforeze dobiveni u korjenčićima *A. cepa* nakon 72-satnog tretmana: a)  $\text{AgNO}_3$ , b) AgNP-citrat, c) AgNP-PVP i d) AgNP-CTAB. K – kontrola, 25 – 25  $\mu\text{M}$ , 50 – 50  $\mu\text{M}$ , 75 – 75  $\mu\text{M}$ , 100 – 100  $\mu\text{M}$ , 500 – 500  $\mu\text{M}$ .

RASPRAVA

## 5. RASPRAVA

U svome diplomskog radu željela sam ispitati utjecaj nanočestica srebra (AgNP) koje su stabilizirane trima različitim omotačima na pojavu oksidacijskog stresa u biljnoj vrsti *Allium cepa* u usporedbi s učinkom koji izaziva ionsko srebro ( $\text{AgNO}_3$ ) primijenjeno u istim koncentracijama.

Prvi parametar koji sam ispitala bio je utjecaj srebra primijenjenog u različitim oblicima na rast korjenčića luka. Naime, korjenčići prvi dolaze u kontakt s potencijalnim onečišćivačem koji se primjenjuje i promjene u njihovu rastu mogu dati najbolju informaciju o toksičnosti koju uzrokuje ionsko srebro, odnosno nanosrebro koje sam ispitala. Inhibicija rasta korjenčića može nam pokazati utječu li primijenjene koncentracije ionskog srebra ili nanosrebra na njegov rast budući da se u korjenčićima čestice nanosrebra najviše akumuliraju (Yin i sur., 2011). Rezultati koje sam dobila nakon tretmana ionskim srebrom ukazuju da je ono imalo štetan učinak na rast korjenčića luka. Dosadašnja istraživanja potvrđuju štetan učinak ionskog srebra na rast korjenčića te njegov utjecaj na pojavu oksidacijskog stresa u različitim biljkama. Yasur i sur. (2013) pokazali su da ionsko srebro sprječava klijanje biljne vrste *Ricinus communis*, utječe na inhibiciju rasta korjenčića te na povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima. O istim učincima  $\text{AgNO}_3$  na biljnu vrstu *Bacopa monnieri* izvijestili su i Krishnaraj i sur. (2012). Nadalje, moja su istraživanja pokazala da je ionsko srebro imalo dvostruko do trostruko negativniji učinak na rast korjenčića u odnosu na AgNP, ako gledamo najveću primijenjenu koncentraciju (500  $\mu\text{M}$ ). Ionsko srebro koncentracije od 25 i 50  $\mu\text{M}$  imalo je stimulirajući učinak na rast, ali koncentracije od 75  $\mu\text{M}$  i veće imale su inhibirajući učinak na rast korjenčića, dok je najveća primijenjena koncentracija (500  $\mu\text{M}$ ) oštetila tkivo korjenčića luka. O vrlo sličnim rezultatima izvijestili su i Vannini i sur. (2013); niže koncentracije (59  $\mu\text{M}$ )  $\text{AgNO}_3$  imale su stimulirajući učinak na rast korjenčića vrste *Eruca sativa*, dok su više koncentracije (118 i 589  $\mu\text{M}$ ) potpuno zaustavile klijanje i rast. Nanočestice srebra pokazale su slabiji učinak na rast korjenčića u odnosu na ionsko srebro, odnosno nisu utjecale na rast ili su ga inhibirale. Uspoređujući tri vrste omotača nanočestica- AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNP-CTAB, najkraće korjenčiće primijetila sam nakon tretmana nanosrebrom AgNP-CTAB. Tretman nanosrebrom AgNP-citrat nije imao učinka na rast korjenčića, nanosrebro AgNP-PVP inhibiralo je rast korjenčića pri koncentracijama od 25 i 75  $\mu\text{M}$ , dok je nanosrebro AgNP-CTAB inhibiralo rast korjenčića pri svim ispitanim koncentracijama, osim najniže (25  $\mu\text{M}$ ). Ovi rezultati ukazuju da je AgNP-CTAB, od tri ispitana omotača, potencijalno najštetniji za rast luka. Neutralni učinak različitih koncentracija vodene otopine nanočestica srebra AgNP-PVP već je zabilježen i ranije u istraživanju koje su proveli neki autori na vrstama *Ricinus communis* (Yasur i sur., 2013) i *Bacopa monnieri* (Krishnaraj i sur., 2012). Nanosrebro AgNP-PVP pokazalo je

stimulirajući učinak na rast korjenčića u vrsti *Eruca sativa* pri koncentracijama od 4.50, 45.3 i 90.6  $\mu\text{M}$  (Vannini i sur., 2013), a u vrsti *Arabidopsis thaliana* bioakumuliralo se više čestica nanosrebra AgNP-PVP nego ionskog srebra (Lee i sur., 2012), iako ovaj rezultat ne možemo direktno povezati s našim rezultatima budući da podatke o bioakumulaciji nemamo. Inhibicija klijanja biljnih vrsta *Phaseolus radiatus* i *Sorghum bicolor* nakon tretmana nanosrebrom AgNP-citrat koncentracije 135  $\mu\text{M}$  zabilježena je u radu Leeja i sur. (2011). Vannini i sur. (2014) zabilježili su smanjeni rast korjenčića žitarice *Triticum aestivum* nakon izlaganja nanosrebru AgNP-PVP koncentracije 4.50 i 45  $\mu\text{M}$ . Ako nanočestice srebra imaju negativan utjecaj na klijanje i rast korjenčića luka, tada se može očekivati minimalna toksičnost i za samu biljku. Možemo reći da su nanočestice srebra ipak u nekoj mjeri djelovale negativno na rast korjenčića luka. Iz dobivenih rezultata mogu zaključiti da su nanočestice srebra AgNP-PVP i AgNP-CTAB nakon primjene u većim koncentracijama pokazale negativan učinak na rast korjenčića luka, dok AgNP-citrat nije imao učinka niti u jednoj ispitanoj koncentraciji.

U svojim istraživanjima ispitala sam i sposobnost ionskog srebra i nanosrebra da u korjenčićima luka izazovu oksidacijski stres, koji se očituje u oštećenjima membranskih lipida, oksidaciji proteina te aktivaciji antioksidacijskog sustava obrane u biljnim stanicama. Lipidnu peroksidaciju smatramo najočitijim simptomom oksidacijskog stresa u biljci, a mjereći sadržaj MDA utvrđujemo razinu oštećenja lipidnih membranskih sustava. Rezultati koje sam dobila pokazuju da se sadržaj MDA u korjenčićima luka povećavao nakon tretmana ionskim srebrom, što je bilo u skladu s mojim očekivanjima. Razina oštećenja lipida u stanici povećavala se s porastom primijenjenih koncentracija  $\text{AgNO}_3$ . Na temelju ovih rezultata zaključila sam da je u korjenčićima tretiranim ionskim srebrom došlo do pojave oksidacijskog stresa, što je također utvrđeno i u jagodama nakon tretmana s  $\text{AgNO}_3$  (Qin i sur., 2005). Iz radova drugih autora poznato je da abiotički stres izaziva pojavu oksidacijskog stresa koja se očituje povećanjem sadržaja MDA odnosno povećanjem lipidne peroksidacije (Tkalec i sur., 2014, Balen i sur., 2013). S druge strane, izmjereni sadržaj MDA u tretmanima nanosrebrom sa sva tri omotača nije pokazao povećanje razine oštećenja lipida. O sličnim rezultatima izvijestili su Zhao i sur. (2012) u kukuruzu nakon tretmana nanočesticama  $\text{CeO}_2$ . Čak sam zabilježila smanjenje sadržaja MDA u korjenčićima nakon tretmana nanosrebrom AgNP-citrat i AgNP-PVP, u odnosu na kontrolu. Smanjenje sadržaja MDA također je pokazano nakon tretiranja različitih kultivara vrste *Pelargonium zonale* (Hatami i Ghorbanpour, 2014) i *Gerbera jamesonii* (Kazemi i Ameri, 2012) vodenom otopinom nanosrebra različitih koncentracija. Do smanjenja sadržaja MDA u stanici može doći usred učinkovitog mehanizma izmjene elektrona u stanici, što dovodi do zastoja curenja elektrona, smanjujući tako produkciju ROS, a samim time i sadržaj MDA (Lu i sur., 2002). S druge strane,

nanosrebro AgNP-CTAB dalo je nešto drugačije rezultate; sadržaj MDA bio je povišen u svim ispitanim koncentracijama u odnosu na kontrolu, osim pri najvećoj (500  $\mu\text{M}$ ). Povećanje sadržaja MDA također je zabilježeno je u vrsti *A. cepa* nakon tretmana nanočesticama  $\text{TiO}_2$  pri koncentraciji od 0.9  $\mu\text{M}$  (Ghosh i sur., 2010).

Karbonilacija proteina tj. kovalentna modifikacija proteina potaknuta reaktivnim oblicima kisika, također je pokazatelj oksidacijskog stresa u biljkama. Rezultati ovog istraživanja ukazali su na smanjenje sadržaja proteinskih karbonila u korjenčićima luka tretiranim ionskim i nanosrebrom AgNP-citrat, za razliku od korjenčića luka tretiranih nanosrebrom AgNP-PVP i AgNP-CTAB, u kojima sadržaj karbonila ne pokazuje statistički značajno odstupanje od kontrolnih uzoraka. Iako je u literaturi poznato da metali uzrokuju oksidacijski stres i oštećenje proteina koje rezultira povećanjem sadržaja karbonila (Balen i sur., 2011b, Tkalec i sur., 2014), u ovom istraživanju takvi su rezultati izostali. Podaci o učinku nanosrebra, kao i drugih nanomaterijala na biljkama, vrlo su oskudna, stoga su potrebna daljnja istraživanja kako bi se mogao razjasniti mehanizam toksičnosti nanosrebra u biljkama.

Istovremeno koncentracija proteina u ekstraktima tkiva korjenčića se povećavala kako su rasle primjenjivane koncentracije ionskog srebra, izuzev tretmana sa najvišom koncentracijom ionskog srebra (500  $\mu\text{M}$ ) u kojem metodom prema Bradfordu nije bilo moguće detektirati sadržaj proteina. Naime, poznato je da oksidacijski stres može potaknuti staničnu apoptozu (Yin i sur., 2011) i smrt stanice, što je i u skladu s rezultatima ovog istraživanja jer je pri 500  $\mu\text{M}$  koncentraciji ionskog srebra u potpunosti bio inhibiran rast korjenčića. Slično kao i u tretmanima nakon ionskog srebra, koncentracije proteine u ekstraktima korjenčića rasle su s povećanjem koncentracija nanosrebra AgNP-citrat i AgNP-PVP.

Antioksidacijski sustav enzima aktivira se tek iza svih ovih oštećenja o kojima je dosad bilo riječi. Oksidacijski stres je glavni čimbenik oštećenja u biljkama koje su izložene različitim oblicima stresa, posebno teškim metalima, a preživljavaju ga inducirajući upravo antioksidacijske enzime (Gill i Tuteja, 2010). Rezultati aktivnosti enzima katalaze, pirogalol peroksidaze i askorbat peroksidaze u korjenčićima luka nakon tretmana ionskim srebrom bili su raznoliki. Smanjenje aktivnosti CAT zabilježeno je mjerenjem aktivnosti i spektrofotometrijski i u gelu pri svim ispitanim koncentracijama u odnosu na kontrolu. U literaturi je zabilježeno smanjenje aktivnosti CAT u *A. cepa* pri većim koncentracijama tretmana Cd (Fatima i Ahmad, 2005), kao i u korijenju duhana nakon tretmana Cd i Zn (Tkalec i sur., 2014), za koje je utvrđeno da su izloženi oksidacijskom stresu. Smanjenje aktivnosti antioksidacijskih enzima može biti posljedica izlaganja biljke stresnim uvjetima koji



dovode do pojave oksidacijskog stresa jer do smanjenja aktivnosti može doći ako se ioni metala vežu na ključna mjesta u enzimu. Ako usporedimo utjecaj 100  $\mu\text{M}$  koncentracije ionskog srebra s utjecajem iste koncentracije nanosrebra sa sva tri omotača na aktivnost CAT, vidljivo je da je u korjenčićima luka nakon tretmana nanosrebrom izmjereno manje smanjenje aktivnosti nego u tretmanima ionskim srebrom, što ide u prilog hipotezi da ionsko srebro izaziva veći oksidacijski stres nego nanosrebro. Aktivnost PPX u korjenčićima luka nakon tretmana ionskim srebrom blago je rasla u odnosu na kontrolu s porastom ispitanih koncentracija. Aktivnost PPX u gelu to i pokazuje: pri koncentraciji od 75 i 100  $\mu\text{M}$  postaje vidljiva izoforma PPX2. U gelu je vidljiva izoforma PPX1 pri koncentraciji od 500  $\mu\text{M}$ , ali spektrofotometrijski nisam zabilježila nikakvu aktivnost. Maksimum vrijednosti zabilježila sam pri 75  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ . Povećane aktivnosti peroksidaza zabilježene su u istraživanjima utjecaja ionskog srebra na klijancima vrsta *Bacopa monnieri* i *Ricinus communis* (Krishnaraj i sur., 2012, Yasur i Rani, 2013), što je u skladu sa mojim rezultatima. U korjenčićima luka tretiranim ionskim srebrom aktivnost APX nije se mijenjala s porastom primijenjenih koncentracija u odnosu na kontrolu, iako rezultati aktivnosti u gelu pokazuju kako izoforma APX3 postaje intenzivnija porastom ispitanih koncentracija  $\text{AgNO}_3$ . Oksidacijski stres uzrokovan ionskim srebrom nije utjecao na povećanu aktivnost ovog enzima.

Ispitani antioksidacijski enzimi, katalaza, pirogalol peroksidaza i askorbat peroksidaza, pokazali su različite promjene nakon tretmana česticama nanosrebra. Nakon izlaganja korjenčića luka nanosrebru AgNP-citrat i AgNP-PVP zabilježila sam smanjenje aktivnosti katalaze, dok tretman nanočesticama AgNP-CTAB nije pokazao razlike u aktivnost CAT u usporedbi s kontrolom. Različit odgovor u aktivnosti katalaze primijećen je prilikom izlaganja biljaka oksidacijskom stresu koje je bilo izazvano različitim abiotičkim čimbenicima. Nakon tretmana kadmijem aktivnost CAT se smanjila u vrstama *Glycine max*, *Phragmites australis*, *Capsicum annum* i *Arabidopsis thaliana*, dok je porast izmjeren u vrstama *Oryza sativa*, *Brassica juncea* i *Triticum aestivum* (Gill i Tuteja, 2010). Nadalje, aktivnost katalaze smanjila se u vrstama *Brassica oleracea* i *B. juncea* nakon tretmana bakrom (Posmyk i sur., 2009), a u kaktusu *Mammillaria gracilis* nakon izlaganja osmotskom stresu (Balen i sur., 2013). Ovi rezultati ukazuju na to da smanjenje aktivnosti katalaze može biti posljedica stresa, što je u skladu s rezultatima koje sam dobila u svom istraživanju. Spektrofotometrijski izmjerene aktivnosti CAT bile su u skladu su s aktivnostima dobivenim u gelu nakon native PAG elektroforeze.

U tretmanima česticama nanosrebra AgNP-citrat i AgNP-CTAB zabilježila sam povećanje aktivnosti pirogalol peroksidaze samo nakon primjene najveće ispitane koncentracije (500  $\mu\text{M}$ ) dok su nanočestice AgNP-PVP izazvale statistički značajno povećanje PPX aktivnosti nakon tretmana koncentracijama od 100 i 500  $\mu\text{M}$ . Povećanje

aktivnosti PPX nakon izlaganja visokim koncentracijama nanosrebra ne čudi jer su peroksidaze, uz katalaze, glavni enzimi obrane biljke protiv oksidacijskog stresa. Povećanje aktivnosti PPX povezano je s povećanom proizvodnjom ROS i povećanim oksidacijskim stresom (Hatami i Ghorbanpour, 2013). Povećane aktivnosti peroksidaza zabilježene su u istraživanjima utjecaja različitih koncentracija vodene otopine AgNP-PVP na klijancima vrsta *Bacopa monnieri* (Yasur i Rani 2013) i *Ricinus communis* (Krishnaraj i sur., 2012). Aktivnost peroksidaza odražava izmijenjena mehanička svojstva stanične stijenke i integriteta stanične membrane u biljci koja je podvrgnuta stresnim uvjetima. Povećanu aktivnost PPX i smanjenu aktivnost CAT zabilježenu u ovim istraživanjima moguće je povezati jer CAT također uklanja vodikov peroksid, ali budući da ima manji afinitet za supstrat, manje je učinkovita nego PPX (Tkalec i sur., 2014). Rezultati spektrofotometrijski izmjerene aktivnosti PPX u skladu su s aktivnošću dobivenom u gelu nakon native PAG elektroforeze.

U korjenčićima luka tretiranim otopinama nanosrebra AgNP-citrat uočila sam smanjenu aktivnosti askorbat peroksidaze pri svim ispitanim koncentracijama, dok tretmani nanočesticama Ag-PVP i AgNP-CTAB nisu pokazali statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu. U dosadašnjim istraživanjima je zabilježena uglavnom povećana aktivnost APX u različitim biljnim vrstama izloženim abiotičkom stresu (Gill i Tuteja, 2010, Balen i sur., 2013, Tkalec i sur., 2014) pa tako i u kukuruzu tretiranim nanočesticama CeO<sub>2</sub> (Zhao i sur., 2012) te u različitim kultivarima vrste *Pelargonium zonale* tretiranim komercijalnim nanosrebrom (Hatami i Ghorbanpour, 2014).

Iz rezultata moga istraživanja vidljivo je da veličina čestica, vrsta omotača i površinski naboj utječu na pojavu oksidacijskog stresa u tretiranome tkivu, kao što su pokazala i druga istraživanja (Yin i sur., 2012, Silva i sur., 2014). Od nanočestica koje sam koristila u svom istraživanju, nanočestice AgNP-citrat su bile znatno veće u odnosu na nanočestice AgNP-PVP i AgNP-CTAB, koje su bile podjednake veličine (Slika 1). Osim veličine čestica, razlikuju se i u naboju; nanočestice AgNP-citrat su negativno nabijene, AgNP-PVP su neutralne, a AgNP-CTAB su pozitivno nabijene. Biljna stanična stijenka funkcionira kao prirodno sito i nanočestice moraju penetrirati kroz staničnu stijenk i stanične membrane epidermalnih slojeva u korjenčićima da bi dospjele u vaskularno tkivo te bile upijene i prebačene u više dijelove biljke. U dosadašnjim istraživanjima utjecaja nanočestica srebra u biljkama najčešće korišteni organski omotači su PVP (Yin i sur., 2012, Silva, 2011.), citrat (Lee i sur., 2011, Silva, 2011.), gumiarabika (Jiang i sur., 2012, Yin i sur., 2012) te razgranati polietilenimin (*branched polyethyleneimine* - BPEI) (Silva, 2011). Silva je u svom radu iz 2011. uspoređivao toksičnost ionskog srebra i nanočestica s tri različita omotača (AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNP-BPEI) na modelnim organizmima *Daphnia magna* i *Escherichia coli*. Iako niti jedan od ova dva organizma nisu biljke, možemo spomenuti rezultate koji su dobiveni.

Istraživanja na *D. magna* pokazala su da su nanočestice AgNP-BPEI najtoksičnije, zatim manje toksično je nanosrebro AgNP-citrat, a najmanje toksične su bile čestice AgNP-PVP. Isti rezultati dobiveni su i na *E. coli*. Ove rezultate mogu povezati sa svojima jer sam utvrdila da postoje razlike između različitih omotača nanosrebra. Naime, na rast korjenčića luka najnegativniji utjecaj imao je omotač CTAB, dok na aktivnost CAT i APX nanočestice AgNP-CTAB nisu pokazale nikakav učinak. Iste čestice nanosrebra nisu imale učinka na sadržaj proteinskih karbonila, ali su utjecale na povećanje sadržaja MDA, što može biti pokazatelj pojave oksidacijskog stresa. Citratni omotač nije utjecao na rast korjenčića, ali jest na aktivnost CAT, PPX i APX te na smanjenje sadržaja MDA i proteinskih karbonila. Omotač PVP je pokazao utjecaj na sve ispitane parametre, osim na sadržaj proteinskih karbonila i aktivnost APX.

Iz rezultata dobivenih u svojim istraživanjima zaključila sam da ionsko srebro ima štetniji učinak od čestica nanosrebra stabiliziranih s bilo kojom od tri ispitane vrste omotača na rast korjenčića luka te na pojavu oksidacijskog stresa. To jasno pokazuju izmjerene duljine korjenčića, razina lipidne peroksidacije, kao i veće smanjenje aktivnosti CAT u tretmanima s ionskim srebrom u odnosu na nanosrebro. Dobiveni rezultati u skladu su s onima iz literature gdje je pokazan štetniji učinak AgNO<sub>3</sub> od AgNP (Yasur i sur., 2013, Yin i sur., 2012, Jiang i sur., 2012).

Za konačne potvrde o utjecaju nanočestica srebra (AgNP) na pojavu oksidacijskog stresa u luku svakako su potrebna daljnja istraživanja. Zasada mogu reći, na temelju dobivenih rezultata iz svoga eksperimentalnog rada, kako niske koncentracije nanosrebra (25, 50 pa čak i 75 µM) ne izazivaju veliki oksidacijski stres u *A. cepa* bez obzira na tip omotača kojim su stabilizirane, ali veće koncentracije (100 i 500 µM) potencijalno mogu biti štetne. Ovi rezultati pokazuju moguću štetnost za biljni svijet ukoliko dođe do povećanog otpuštanja AgNP u okoliš. Što se tiče tipa omotača koji je korišten za stabilizaciju nanočestica, pokazan je različiti učinak na ispitane parametre. Iako je AgNP-CTAB pokazao utjecaj na najmanji broj ispitanih parametara (3), smanjenje rasta korjenčića, povećanje sadržaja MDA i aktivnosti PPX ukazuju na to da je najštetniji za rast korjenčića luka ako se primjenjuje u većim koncentracijama. Ovaj rezultat mogu povezati s radom Eunjoo i sur. (2011), koji su pokazali da je AgNP-CTAB i u malim koncentracijama imao letalni, baktericidni učinak na *E. coli*.

ZAKLJUČAK

## 6. ZAKLJUČAK

1. Ionsko srebro pokazalo je štetan učinak na rast korjenčića *Allium cepa* te na pojavu oksidacijskog stresa u njima. Parametri koji to pokazuju su povećana razina lipidne peroksidacije, smanjene aktivnosti CAT te povećane aktivnosti PPX u odnosu na kontrole.
2. Nanočestica srebra pokazale su manji utjecaj na rast korjenčića *A. cepa* te na pojavu oksidacijskog stresa u usporedbi s  $\text{AgNO}_3$ .
3. Čestice nanosrebra stabilizirane trima različitim omotačima (AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNP-CTAB) pokazale su razliku u učinku na ispitane parametre.
4. Smanjenje rasta korjenčića, povećanje sadržaja MDA i aktivnosti PPX pokazuju da je nanosrebro AgNP-CTAB najštetnije za korjenčiće luka ako se primjenjuje u većim koncentracijama.
5. Nanosrebro AgNP-PVP pokazalo je inhibirajući učinak na rast korjenčića, dok su AgNP-citrat i AgNP-PVP pokazali podjednaki utjecaj na pojavu oksidacijskog stresa.
6. Dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost štetnosti AgNP za biljni svijet ukoliko dođe do njihovog povećanog otpuštanja u okoliš.

LITERATURA

## 7. LITERATURA

Aebi M (1984). Catalase *in vitro*. Meth Enzymol 105:121-126

Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. Current Science 82:1227-1238

Balen B, Pavoković D, Peharec Štefanić P, Krsnik-Rasol M (2011a). Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Zagreb. Hrvatska sveučilišna naklada

Balen B, Tkalec M, Šikić S, Tolić S, Cvjetko P, Pavlica M, Vidaković Cifrek Ž (2011b). Biochemical responses of *Lemna minor* experimentally exposed to cadmium and zinc. Ecotoxicology 20:815-826

Balen B, Tkalec M, Rogić T, Šimac M, Peharec Štefanić P, Rončević S, Pitarević-Svedružić L, Krsnik-Rasol M (2013). Effects of iso-osmotic NaCl and mannitol on growth, proline content, and antioxidant defense in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. *in vitro*-grown cultures. In Vitro Cell Dev Biol Plant 49:421-432

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254

Chance B, Maehly AC (1955). Assay of catalases and peroxidases. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds) Meth Enzymol Academic Press, New York, pp 764-775

Cheung KL, Chen H, Chen Q, Wang J, Ho HP, Wong CK, Kong SK (2012). CTAB-coated gold nanorods elicit allergic response through degranulation and cell death in human basophils. Nanoscale 4:4447-4449

Cvjetko P, Tolić S, Šikić S, Balen B, Tkalec M, et al. (2010). Effect of copper on the toxicity and genotoxicity of cadmium in duckweed (*Lemna minor* L.). Arh Hig Rada Toksikol 61:287-296

Dalle-Donnea I, Rossib R, Giustarinib D, Milzania A, Colombo R (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clinica Chimica Acta 329:23-38

Eunjoo B, Park HJ, Park J, Yoon J, Kim Y, Choi K, Yi J (2011). Effect of chemical stabilizers in silver nanoparticle suspensions on nanotoxicity. Bull Korean Chem Soc 32:613-619

Farajia M, Yaminia Y, Tahmasebia E, Saleha A, Nourmohammadianb F. (2010). Cetyltrimethylammonium bromide-coated magnetite nanoparticles as highly efficient adsorbent for rapid removal of reactive dyes from the textile companies' wastewaters. J Iran Chem Soc 7:130-144.

Fatima RA, Ahmad M (2005). Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for detection of toxic heavy metals in wastewaters. Sci Total Environ 346:256- 273

Geremias R, Fattorini D, Favere VTD, Pedrosa RC (2009). Bioaccumulation and toxic effects of copper in common onion *Allium cepa* L. Chem Ecol 1:19-26

Geremias R, Fattorini D, Favere VTD, Pedrosa RC (2011). Bioaccumulation and adverse effects of trace metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in the common onion *Allium cepa* as a model in ecotoxicological bioassays. Chem Ecol 6:515-522

Ghosh M, Bandyopadhyay M, Mukherjee A (2010). Genotoxicity of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. *Chemosphere* 81:1253-1262

Gill SS, Tuteja N (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48:909-930

Hatami M, Ghorbanpour M (2013). Effects of nanosilver on physiological performance of *Pelargonium* plants exposed to dark storage. *J Hortic Res* 21:15-20

Hatami M, Ghorbanpour M (2014). Defense enzyme activities and biochemical variations of *Pelargonium zonale* in response to nanosilver application and dark storage. *Turk J Biol* 38:130-139

Heath RL, Packer L (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I-Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189-198

Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol* 42:462-468

Ivanković, M. (2011). Nanomaterijali i nanoproizvodi – mogućnosti i rizici. *Polimeri* 32:23-28.

Jiang HS, Li M, Chang FY, Li W, Yin LY (2012). Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO<sub>3</sub> toxicity to *Spirodela polyrhiza*. *Environ Toxicol Chem* 31:1880-1886

Kazemi M, Ameri A (2012). Postharvest life of cut gerbera flowers as affected by nano-silver and acetylsalicylic acid. *Asian J Biochem* 7:106-111.

Krishnaraj C, Jagan EG, Ramachandran R, Abirami SM, Mohan N, Kalaichelvan PT (2012). Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process Biochem* 47:651-658.

Kumari M, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2009). Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Sci Total Environ* 407:5243-5246.

Labudda M (2013). Lipid peroxidation as a biochemical marker for oxidative stress during drought. An effective tool for plant breeding. E-wydawnictwo, Poland, <http://www.e-wydawnictwo.eu/Document/DocumentPreview/3342>

Lee WM, Kwak JI, An YJ (2011). Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*. Media effect on phytotoxicity. *Chemosphere* 86:491-499

Lee JG, Qiang W, Ying Y, Zhang W, Matt G, Li K, Huang Y, Chen Y, Kolmakov A, Ma X (2012). Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology* 7:323-327

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E (1994). Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. *Method Enzymol* 233:346-357

Lu CM, Zhang CY, Wen JQ, Wu GR, Tao MX (2002). Research of the effect of nanometer materials on germination and growth enhancement of *Glycine max* and its mechanism. *Soybean Sci* 21:168-171

Mittler R, Zilinskas BA (1993). Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal Biochem* 212:540-546



Mittler R (2012). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci 7:405-410

Monica RC, Cremonini R (2009). Nanoparticles and higher plants. Caryologia 62:161-5.

Nakano Y, Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol 22:867-880

Posmyk MM, Kontek R, Janas KM (2009). Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. Ecotoxicol Environ Safety 72:56-602

Qin Y, Zhang S, Zhang L, Zhu D, Syed A (2005). Response of *in vitro* strawberry to silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>). Hort Science 40:747-751

Sekhon BS (2014). Nanotechnology in agri-food production: An overview. Nanotechnol Sci Appl 7:31-53

Seltenrich N (2013). Nanosilver: Weighing the risks and benefits. Environ Health Perspect 121:220-225

Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miygawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. J Exp Bot 53:1305-1319

Silva, TU (2011). An evaluation of coating material dependent toxicity of silver nanoparticles. ETD Paper 1229. <http://dc.etsu.edu/etd/1229>

Silva T, Pokhrel LR, Dubey B, Tolaymat TM, Maier KJ, Liu X. (2014). Particle size, surface charge and concentration dependent ecotoxicity of three organo-coated silver nanoparticles: Comparison between general linear model-predicted and observed toxicity. Sci Total Environ 468-469:968-976

Song U, Jun H, Waldman B, Roh J, Kim Y, Yi J, Lee EJ (2013). Functional analyses of nanoparticle toxicity: A comparative study of the effects of TiO<sub>2</sub> and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). Ecotoxicol Environ Safety 93:60-67

Stampoulis D, Sinha SK, White JC (2009). Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. Environ Sci Technol 43:9473-9479

Tkalec M, Peharec Štefanić P, Cvjetko P, Šikić S, Pavlica M, Balen B (2014). The effects of cadmium-zinc interactions on biochemical responses in tobacco seedlings and adult plants. PLoS ONE 9(1): e87582. doi:10.1371/journal.pone.0087582

Vannini, C, Domingo, G, Onelli, E, Prinsi B, Marsoni M, Espen L, Bracale M. (2013). Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. PLOS ONE 8:e6875 doi:10.1371/journal.pone.0068752

Vannini C, Domingo G, Onelli E, De Mattia F, Bruni I, Marsoni M, Bracale M (2014). Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on germinating wheat seedlings. J Plant Physiol doi: 10.1016/j.jplph.2014.05.002

Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inze D, Van Camp W (1997). Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C<sub>3</sub> plants. EMBO J 16: 4806-4816

Woodbury WA, Spencer K, Stahlmann MA (1971). An improved procedure using ferricyanide

for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem* 44:301-305

Xiong D, Fang T, Yu L, Sima X, Zhu W (2010). Effects of nano-scale TiO<sub>2</sub>, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Sci Total Environ* 409:1444-1452

Yasur J, Rrani PU (2013). Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. *Environ Sci Pollut Res* 20:8636-8648

Yin L, Cheng Y, Espinasse B, Colman PB, Auffan M, Wiesner M, Rose J, Liu J, Bernhardt ES (2011). More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environ Sci Technol* 45:2360-2367

Zhao L, Peng B, Hernandez-Viesca JA, Rico C, Sun Y, Peralta-Videa JR, Tang X, Niu G, Jin L, Varela-Ramirez A, Zhang J, Gardea-Torresdey JL (2012). Stress response and tolerance of *Zea mays* to CeO<sub>2</sub> nanoparticles: Cross talk among H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, heat shock protein, and lipid peroxidation. *ACS Nano* 6:9615-9622

Zheng L, Hong FS, Lu SP, Liu C (2005) Effect of nano-TiO<sub>2</sub> on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biol Trace Elem Res* 104:83-92

ŽIVOTOPIS

## 8. ŽIVOTOPIS

Zovem se Anita Milošić. Rođena sam 13. studenog 1990. u Sisku. Trenutno živim u Petrinji. Osnovnu školu i opću gimnaziju završila sam u Petrinji s odličnim uspjehom. Akademske godine 2009./2010. upisala sam Prirodoslovno - matematički fakultet u Zagrebu, smjer molekularna biologija. Završila sam preddiplomski studij molekularne biologije 2012. godine. Trenutno završavam diplomski studij molekularne biologije. Sudjelovala sam na Kongresu mladih kemijskih inženjera u Zagrebu 2014. godine. Na fakultetu sam obavljala stručnu laboratorijsku praksu u Laboratoriju za elektroforezu proteina pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. B. Balen. Govorim i pišem engleski jezik te sam informatički pismena. U poslu sam spremna na suradnju i timski rad, ali sam također i vrlo samostalna.

Kongresna priopćenja:

1. **Milošić, Anita**; Žužić, Lorena; Žužić, Marta; Rogić, Tea; Cvjetko, Petra; Domijan, Ana-Marija; Vinković Vrček, Ivana; Balen Biljana. Utjecaj nanosrebra na rast i pojavu oksidacijskog stresa u korjenčićima luka (*Allium cepa*). Zbornik radova X. Susreta mladih kemijskih inženjera. Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2014. 93-93 (poster, domaća recenzija, sažetak).
2. Cvjetko, Petra; **Milošić, Anita**; Yu, Suyeon; Domijan, Ana-Marija; Vinković Vrček, Ivana; Balen, Biljana. Effects of three different organo-coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. Book of Abstracts of SEB Annual Main Meeting Manchester 2014 / Talja Dempster (ur.). Manchester: Society of Experimental Biology, 2014. 154-154 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).